

**Einsatz der komprehensiven zweidimensionalen
Flüssigchromatographie zur Analyse von Naturstoffen
und die Entwicklung der Recycling Chromatographie
zur Trennung chiraler Verbindungen**

Vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

der Bergischen Universität Wuppertal

genehmigte Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

- Doktor der Naturwissenschaften -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Roman Dück

aus Pawlodar

Wuppertal, August 2012

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20121106-123208-2

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:hbz:468-20121106-123208-2>]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit
von August 2009 bis Juli 2012
auf Anregung und unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Oliver J. Schmitz
im Arbeitskreis der Analytischen Chemie

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig im Arbeitskreis Analytische Chemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. O.J. Schmitz durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, den 08.08.2012

Roman Dück

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Oliver J. Schmitz, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die interessante Themenstellung sowie die hilfreiche und stetige Unterstützung in Form von Diskussionen und Ratschlägen.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Gäb danke ich für die fachlichen Gespräche, die hilfreichen Anregungen und die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Marc Constapel danke ich dafür, dass ich jederzeit bei unterschiedlichsten Fragstellungen Hilfe von ihm erhalten habe.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Matthias Albers für seine freundlichen und sachkundigen Hilfestellungen bei den ersten Schritten in der Flüssigchromatographie.

Dr. René Mönnikes danke ich für die Programmierung der Software zur Auswertung von zweidimensionalen Chromatogrammen.

Herrn Eduard Deibel danke ich für die Übernahme von Vorkorrekturen dieser Arbeit.

Bei Frau Anja Schultze und Herrn Roman Roosen bedanke ich mich für ihr großes Engagement bei der Durchführung ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten.

Herrn Dr. Walter V. Turner danke ich für die Korrekturen der englischen Korrespondenz.

Allen Kollegen der analytischen Chemie und insbesondere den Mitgliedern des IFH danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit.

Schlussendlich danke ich meiner Freundin Hannah. Sie war trotz ihrer eigenen Promotion immer für mich da, hat mich fachlich und bei Erstellung von Texten unterstützt und die Zeit während meiner Doktorarbeit durch ihre Motivation erleichtert.

Abstract

In this work, several types of column switching were used for a number of analytical problems in liquid chromatography.

Thus, comprehensive two-dimensional liquid chromatography was used for the study of tea. This developed into a semi-quantitative comparison of catechins in matcha and sencha tea. This revealed that about twice as much catechins is absorbed in the consumption of matcha tea as with sencha tea.

To evaluate the best combination of columns in the LC x LC, a vector based mathematical model was developed. This calculation makes it possible to determine the effective area in a two-dimensional chromatogram, independently of the complexity of the distribution of the chromatogram spots. With this method, the best combination of columns for the analysis of *Radix Angelicae sinensis* was determined on the basis of the effective area, the peak capacity and the orthogonality. These results do not correlate with the results of the Neue-test. The best column selection is determined not only by the selectivity of the phases but also by the properties of the analyte in the complex sample. Thus, the optimal combination of columns to assess the separation efficiency - directly from the two-dimensional chromatogram - is of great importance.

The separation efficiency of on-line LC x LC was compared with off-line LC x LC, with the analysis of *Radix Angelicae sinensis* as an example. This showed, as was to be expected, that the off-line LCxLC method had a higher peak capacity (2683) than on-line LC x LC (661). However, this was accompanied by a significant increase in analysis time, from 5 to 28 hours. No significant difference was found in the orthogonality and the consumption of solvents. The great advantage of the online method is the larger number of substances detected, probably because ca. 30 % of the volatile analytes disappear during storage of the fractions in the off-line method.

For the investigation of white wine, ion-exchange chromatography was coupled with reverse-phase chromatography (IC-LC x LC) for the first time. This technique allows the simultaneous analysis of phenols, polyphenols, phenolic acids and other components in the wine. A higher degree of orthogonality could be achieved than with previously known applications of this method. It was also possible by the use of suitable eluents to couple the chromatographic system with a mass spectrometer.

Finally, in this work a new recycling method for HPLC was developed which is suitable for the separation of substances with a similar selectivity factor (e.g., enantiomers). The

separation of carvone enantiomers showed the advantage of this method - the low peak broadening during the recycling process - over the CLR method.

Abkürzungen

1.D	Erste Dimension
2.D	Zweite Dimension
α	Trennfaktor
ACN	Acetonitril
A_{eff}	effektive Fläche
AP	engl. <i>alternate pumping recycling chromatography</i>
bar	Bar
BOO	engl. <i>boomerang</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CN	Cyano-
CLR	engl. <i>closed-loop recycling chromatography</i>
Δ	Differenz
d	Verbreiterungsfaktor
DAD	engl. <i>diodenarray detektor</i>
DC x DC	Komprehensive zweidimensionale Dünnschichtchromatographie
E	Erweiterte polare Selektivität
EIC	engl. <i>extracted ion chromatogram</i>
Engl.	Englisch
ESI	Elektrospray-Ionisation
ER	engl. <i>external recycle chromatography</i>
et. al.	lateinisch <i>und andere</i>
Extr.	Extrakt
FAN	engl. <i>fan</i> Fächer
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenenfalls
H	Bodenhöhe
h	Stunde
HILIC	hydrophile Interaktionschromatographie
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IC	Ionenaustauschchromatographie
ID	Innendurchmesser

Abkürzungen

k	Retentionsfaktor
k_a	Retentionsfaktor der ersten Komponente
k_w	Retentionsfaktor der letzten Komponente
k_e	Retentionsfaktor bei gegebener Elutionskraft des Eluenten
L	Länge
LC	engl <i>liquid chromatography</i> , Flüssigchromatographie
LC-LC	Reihenschaltung mehrere Säulen unterschiedlicher Selektivität
LC x LC	Komprehensive zweidimensionale Flüssigchromatographie
M	Molarität
M'	mittleren Anzahl der Modulationen pro Peak der ersten Dimension
μ	Viskositätskoeffizient des Lösungsmittels
MeOH	Methanol
min	Minuten
μL	Mikroliter
mL	Milliliter
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
MP	mobile Phase
MS	Massenspektrometer
MSR	engl. <i>moving solvent recycling chromatography</i>
m/z	Masse zu Ladung Verhältnis
n	Peakkapazität
n_{iso}	Peakkapazität im Fall der isokratischen Eluation
n_{grad}	Peakkapazität unter Verwendung eines Gradienten
$(\text{NH}_4)\text{HCOO}$	Ammoniumformiat
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	Ammomiumcarbonat
nm	Nanometer
NP	Normalphasenchromatographie
O	Orthogonalität
P	Drück
<i>P</i>	Phenolische Wechselwirkungen
PAR	engl. <i>parallerogram</i>
PEEK	Polyetheretherketon

Abkürzungen

PFP	Pentafluorphenol
pH	der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pK _s	Gleichgewichtskonstante für Protolyse eines Stoffes mit Wasser
P _M	Dauer der Sammelphase
PTFE	Polytetrafluorethylen
R und r	Radius
RP	engl. <i>reversed phase</i> , Umkerphasenchromatographie
RP18	RP Stationärephase enthält Octadecyl-Ketten
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> Umdrehungen pro Minute
σ	Standardabweichung von normalverteilten gaußförmigen Peaks
<σ*>	Verbreiterungsfaktor
S	Silanolische Wechselwirkungen
SAX	engl. <i>strong anion exchange</i>
s	Sekunden
SFC	engl. <i>supercritical fluid chromatography</i>
SIC	engl. <i>selected ion chromatogram</i>
SMB	engl. <i>simulated moving-bed chromatography</i>
SP	stationäre Phase
R _s	Auflösung
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TIC	engl. <i>total ion chromatogram</i>
TOF	engl. <i>Time-of-flight</i> , Flugzeitmassenspektrometer
t _d	Totzeit
t _{dr}	gesamte Retentionszeit
t _m	Analysedauer inklusiver der Totzeit
t _G	die Gradientenzeit
t _r	netto Retentionszeit
t _w	netto Analysedauer
UHPLC	engl. <i>ultra high performance liquid Chromatography</i>
u	Flussgeschwindigkeit
UV	ultravioletes Licht
vis	für den Menschen sichtbares Licht
v	Hydrophoben Wechselwirkungen

Abkürzungen

w_b	Peakbasisbreite
w_h	Peakbreite auf der halben Höhe
WEG	engl. <i>wedge</i> Keil

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Flüssigchromatographische Trenntechniken.....	4
2.1.1 Eindimensionale HPLC.....	5
2.1.1.1 Peakkapazität.....	12
2.1.2 Multidimensionale HPLC	13
2.1.3 Komprehensiv zweidimensionale HPLC	15
2.1.3.1 Orthogonalität.....	20
2.1.4 Recycling Chromatographie.....	21
2.2 Probenbeschreibung	24
2.2.1 Matcha-Tee.....	24
2.2.2 <i>Radix Angelicae sinensis</i>	25
2.2.3 Weißwein	25
3 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	27
4 Ergebnisse und Diskussion.....	28
4.1 Aufbau eines on-line komprehensiven zweidimensionalen HPLC-Systems	28
4.1.1 Anforderungen an das Trennsystem.....	28
4.1.1.1 Säulendimensionen und Säulenmaterial.....	29
4.1.2 Anforderungen an den Detektor	36
4.1.2.1 UV/Vis – Detektor	36
4.1.2.2 Massenspektrometer.....	37
4.1.3 Analyse von Matcha-Tee mittels komprehensiver zweidimensionaler HPLC	39
4.1.3.1 Vergleich von Matcha- und Sencha-Tee	43
4.2 Bestimmung der Peakverteilung bei zweidimensionalen Analysen	46
4.2.1 Berechnung der Orthogonalität	46
4.2.2 Berechnung der Peakkapazität	52
4.2.2.1 Berechnungen der Peakkapazität der ersten und der zweiten Dimension in einem zweidimensionalen Chromatogramm.....	52
4.2.2.2 Berechnung der Peakkapazität für ein zweidimensionales Chromatogramm..	53
4.2.3 Analyse von <i>Radix Angelicae sinensis</i> mit drei unterschiedlichen Säulenkombinationen	54
4.2.4 Vergleich von on-line und off-line LC x LC.....	60

4.3 Experimenteller Aufbau eines IC-LC x LC-HPLC Systems unter Verwendung der Ionenaustauschchromatographie und der Umkehrphasenchromatographie.....	63
4.3.1 Untersuchung von Wein.....	70
4.4 Entwicklung einer Moving Solvent Recycling-Chromatographie Methode.....	74
4.4.1 Experimenteller Aufbau eines Moving Solvent Recycling-Chromatographie Systems.....	74
4.4.2 Studie zur nicht vollständigen Übertragung der Fraktionen bei der Moving Solvent Recycling-Chromatographie	76
4.4.3 Vergleich unterschiedlicher Recycling-Methoden.....	81
5 Zusammenfassung.....	86
6 Experimenteller Teil.....	88
6.1 Geräte	88
6.1.1 Flüssigchromatographische Systeme	88
6.1.2 Massenspektrometer.....	89
6.1.3 Sonstige Geräte	89
6.1.4 Software	90
6.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	91
6.3 Methoden.....	94
6.3.1 Aufbau eines on-line komprehensiven zweidimensionalen HPLC Systems	94
6.3.2 Bestimmung der Peakverteilung bei zweidimensionalen Analysen	99
6.3.3 Komprehensive zweidimensionale Analyse von Weißwein.....	103
6.3.4 Erstellung einer Moving Solvent Recycling-Chromatographie Methode.....	105
7 Anhang	108
7.1 Abbildungsverzeichnis	113
7.2 Tabellenverzeichnis.....	118
8 Literaturverzeichnis.....	119

1 Einleitung

Die Analyse von unbekanntem Proben kann in zwei Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Schritt werden die Einzelbestandteile voneinander getrennt. Die am weitesten verbreitete Trenntechnik ist die Chromatographie.

Die Chromatographie ist ein Verfahren zur Auftrennung von Stoffen aus einem Gemisch. Zu Grunde liegt ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem die Stoffe zwischen zwei Phasen verteilt werden. Eine mobile Phase (MP) wird an einer stationären Phase (SP) vorbeigeführt [1]. Die Grundvoraussetzung für alle chromatographischen Methoden ist die Nichtmischbarkeit der stationären und der mobilen Phasen. Je nach Wahl der mobilen Phase werden die Methoden in drei Klassen unterteilt [2]:

Die chromatographischen Methoden, in denen Gas als mobile Phase verwendet wird, wird als Gaschromatographie (GC) bezeichnet.

Bei der Verwendung von überkritischen Flüssigkeiten als MP handelt es sich um eine SFC (engl. *supercritical fluid chromatography*).

In dieser Arbeit wird eine Flüssigkeit als MP eingesetzt. Diese Technik wird als Flüssigchromatographie (LC, engl. *liquid chromatography*) bezeichnet.

Die Trennverfahren lassen sich zudem noch anhand der Retentionsmechanismen in zwei Gruppen unterteilen [3]:

Bei der Verteilungschromatographie beruht die Trennung auf den unterschiedlichen Löslichkeiten der Analyten in beiden Phasen.

Ein weiterer Trennmechanismus in der Chromatographie ist die Adsorption. Die Analyten werden an der SP adsorbiert und von dem Eluenten desorbiert.

Infolge unterschiedlicher Verteilungs- oder Adsorptionsverhalten können die Stoffe voneinander getrennt werden. Die Grenzen zwischen den Verfahren sind in der Regel fließend.

Die Untersuchung von pflanzlichen Produkten stellt für den Analytiker eine große Herausforderung dar. Die Zusammensetzung der Proben ist in der Regel sehr komplex. Sowohl die hohe Anzahl der Stoffe als auch die Zugehörigkeit der Stoffe zu unterschiedlichen Stoffklassen macht die Analyse schwierig. Aus diesen Gründen werden an die Trenntechnik hohe Ansprüche gestellt. Andererseits eignen sich solche Proben, um die Qualität einer Trennmethode zu beurteilen. Als Modelproben wurden in dieser Arbeit drei Naturprodukte (Tee, eine Heilpflanze aus der traditionellen chinesischen Medizin, *Radix Angelicae sinensis* und Wein) analysiert.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Flüssigchromatographische Trenntechniken

Abhängig von den verwendeten stationären und mobilen Phasen und somit aufgrund unterschiedlichem Trennverhalten unterscheidet man bei der Flüssigchromatographie mehrere Untergruppen [1]. An dieser Stelle werden nur die Trennmethoden beschrieben, die auch in dieser Arbeit angewendet wurden.

Die Normalphasenchromatographie (NP) ist ein Verfahren bei dem die stationäre Phase aus einem polaren Material besteht [1]. In der Regel werden Kieselgel oder Aluminiumoxid verwendet. Als mobile Phase werden unpolare organische Lösungsmittel eingesetzt. Die Trennung erfolgt aufgrund der polaren Wechselwirkungen der Analyten.

Die Weiterentwicklung der NP bildet die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC). Auch hier wird das gleiche Grundprinzip angewendet nämlich eine polare stationäre und eine weniger polare mobile Phase. Die Variation der stationären Phasen reicht dabei von unmodifiziertem oder leicht modifiziertem (mit Diol- oder Aminogruppen) Kieselgel bis zu komplexeren Phasen mit Zwitterionen als Modifikation [4]. Der Eluent ist anders als bei der NP in der Regel ein Acetonitril/Wassergemisch [4]. Das Prinzip des Trennprozesses bei der HILIC ist bislang ungeklärt und wahrscheinlich vielschichtig. Während in der NP die Adsorptionschromatographie vorherrscht, wird bei HILIC in erster Linie von einer Verteilungschromatographie ausgegangen. Es wird angenommen, dass sich eine wässrige Schicht auf der Oberfläche der SP bildet. Die Analyten werden unter anderem aufgrund unterschiedlicher Löslichkeit in der MP und in der wässrigen SP getrennt.

In der Umkehrphasenchromatographie (RP, engl. *reversed phase*) ist im Gegensatz zur NP die mobile Phase polar und die stationäre Phase unpolar. Als Eluent wird meistens ein Gemisch aus Wasser und Methanol oder Acetonitril verwendet [3]. Als SP wird auch hier in den meisten Fällen ein modifiziertes Kieselgel eingesetzt. Die am weitesten verbreitete Phase ist ein mit Octadecylresten derivatisiertes Kieselgel (RP18). Bei dieser Trenntechnik ist vor allem die Verteilungschromatographie vorherrschend. Eine zusätzliche Selektivität kann durch Einführen von weiteren funktionellen Gruppen realisiert werden. So finden z.B. Phasen mit Cyano- (CN), Diol-, Amino- oder Pentafluorphenolgruppen (PFP) ebenfalls Anwendung. Die Ionenaustauschchromatographie (IC) ist ein Sonderfall der Flüssigchromatographie. Während die oben dargestellten Methoden in erste Linie für neutrale, ungeladene Stoffe

geeignet sind, ist es mit der IC möglich, Ionen zu trennen [1]. Als SP wird, je nach Fragestellung, ein Kationen- oder Anionentauscher verwendet. Das Trägermaterial kann wiederum aus Kieselgel oder organischen Polymeren, wie z.B. Poly(Styrendivinylbenzol), bestehen. Letztere sind bei höheren Drücken bzw. in einem Eluenten mit höheren Anteilen eines organischen Lösungsmittels nicht stabil. Ihr großer Vorteil ist dagegen die Stabilität über einen weiten pH-Bereich. Die IC ist ein typischer Vertreter der Adsorptionschromatographie. Die Wechselwirkungen zwischen den Ionen und den geladenen funktionellen Gruppen des Ionentauschers führen zur Adsorption der Ionen. Der Eluent enthält ebenfalls Ionen, die an dem Ionentauscher adsorbieren, sodass Analyt- und Elutionen um die Adsorptionsplätze konkurrieren.

Die chirale Chromatographie dient zur Auftrennung von Enantiomerenpaaren [1]. Die Trennung von solchen Substanzen erfolgt an oberflächen-modifizierten Kieselgelen mit optisch aktiven Verbindungen.

2.1.1 Eindimensionale HPLC

Die eindimensionale Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) ist ein Trennverfahren, das zu den Standardtechniken der Analytik gehört. Die Trennsäule bildet das Kernstück einer HPLC-Anlage.

Eine schematische Darstellung eines HPLC-Systems ist in Abbildung 1 gezeigt. Der Eluent wird von einer Pumpe zur Säule befördert. Zwischen der Pumpe und der Säule befindet sich ein Injektor. Dieser soll ein definiertes Volumen der zu untersuchenden Probe in das System injizieren ohne den Fluss zu unterbrechen und Druckschwankungen im System möglichst klein halten. In der Säule erfolgt die Trennung der Analyten. Die Substanzen mit höherer Affinität zur stationären Phase verbleiben längere Zeit in der Säule und eluieren zeitverzögert im Vergleich zu Substanzen mit geringerer Affinität. Dieses Verhalten wird als Retention bezeichnet.

Nachdem die Analyten die Säule verlassen haben, werden sie mit einem Detektor registriert.

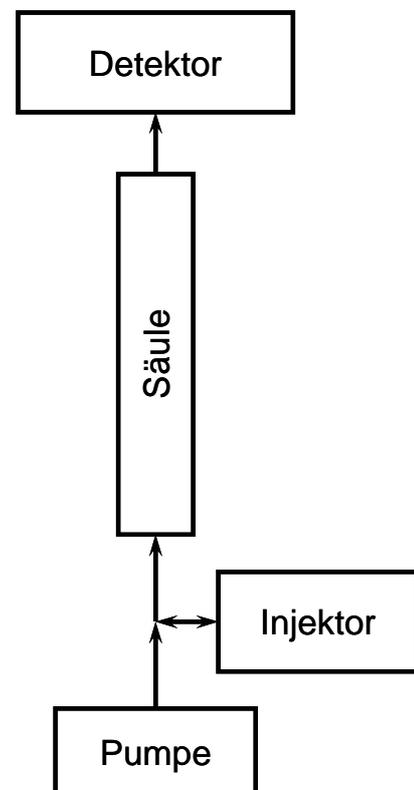


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines HPLC-Systems

Die Funktionsweise der Detektoren ist sehr unterschiedlich und reicht vom unselektiven Brechungsindexdetektor bis zu selektiven und sensitiven massenspektromerischen Detektoren. In dieser Arbeit wurden ein Diodenarray Detektor (DAD) und ein Time-of-Flight Massenspektrometer (TOF-MS) als Detektoren eingesetzt. Neben der Detektion liefern diese Detektoren insbesondere das MS strukturelle Informationen, sodass eine Charakterisierung der Analyten ermöglicht wird.

Wie in Abbildung 2 gezeigt, wird die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um vom Injektor bis zum Detektor zu gelangen, als Totzeit (t_d) bezeichnet. Die gesamte Retentionszeit (t_{dr}) beschreibt die Zeit, die die Analyten für die gleiche Strecke benötigen. Die um die Totzeit reduzierte gesamte Retentionszeit wird als korrigierte Retentionszeit (t_r) bezeichnet [3].

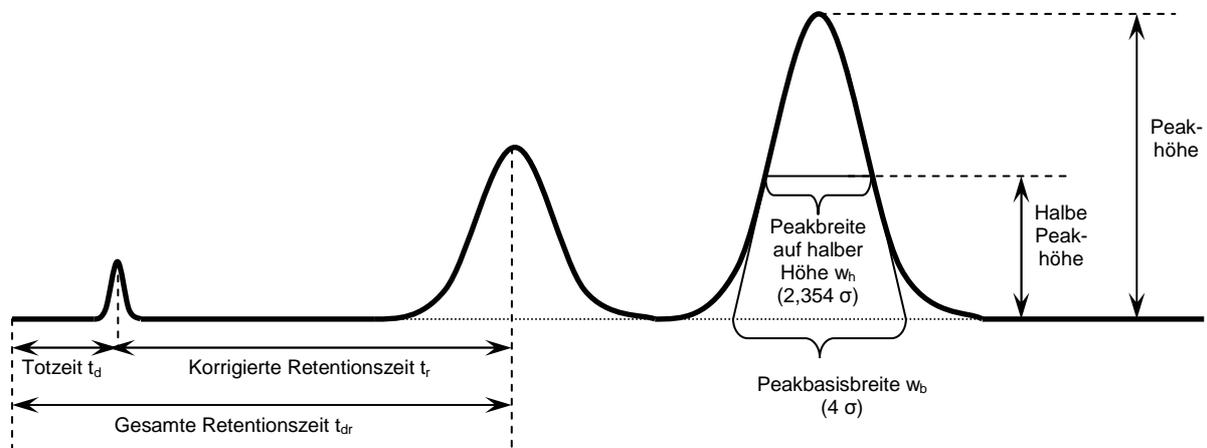


Abbildung 2: Fundamentale Größen in einem Chromatogramm

Mit diesen Parametern kann der Retentionsfaktor k und die Selektivität α berechnet werden (Gleichungen 1 und 2) [3]. Der Retentionsfaktor entspricht dem Verhältnis der Aufenthaltzeit der Analyten in der stationären und mobilen Phase. Die Selektivität beschreibt den Retentionszeitunterschied zwischen zwei Analyten.

$$k = \frac{t_{dr} - t_d}{t_d} = \frac{t_r}{t_d}$$

Gleichung 1

$$\alpha = \frac{t_{r2}}{t_{r1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

Gleichung 2

Sowohl bei dem chromatographischen Prozess als auch beim Durchströmen der Analyten durch das Analysensystem (Injektor, Kapillaren und Detektor) kommt es zur Peakverbreiterung. Das am Detektor vorliegende Signal wird im Idealfall als normalverteilter, gaußförmiger Peak beobachtet. Die Breite der Peaks ist ein Gütemerkmal der Trennung. Der Abstand zwischen den Schnittpunkten der bis zur Basis verlängerten Wendetangenten wird Peakbasisbreite (w_b) genannt (Abbildung 2) und entspricht der vierfachen

Standardabweichung (4σ). In der Praxis ist es einfacher, die Peakbreite auf halber Höhe (w_h) zu bestimmen. Diese beträgt $2,354\sigma$ [1].

Die Effizienz einer Trennsäule kann in Bodenzahlen (N) angegeben werden [3]:

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma}\right)^2 = 16 * \left(\frac{t_r}{w_b}\right)^2 = 5,54 * \left(\frac{t_r}{w_h}\right)^2$$

Gleichung 3

Als ein chromatographischer Boden wird ein imaginärer Bereich der Säule beschrieben, in dem sich ein Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen des Analyten in der MP und SP einstellt. In der Chromatographie wird eine hohe Trennleistung angestrebt, sodass eine hohe Bodenzahl erforderlich ist. Die Bodenzahl einer Säule ist proportional zur Säulenlänge L und umgekehrt proportional zur Bodenhöhe H :

$$N = \frac{L}{H}$$

Gleichung 4

Die Bodenhöhe ist ein theoretischer Wert, der zur Beurteilung der Effizienz der stationären Phase herangezogen werden kann. Für eine gute Trennung wird eine kleine Bodenhöhe angestrebt.

Die Auflösung (R_s) beschreibt die Qualität einer Trennung zweier Stoffe [3]. Danach ist die Trennung zweier Substanzen von der Retentionszeitdifferenz und der Breite der Peaks abhängig [1].

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}}$$

Gleichung 5

Bei einer Auflösung von 1,0 kommt es zu einer 2%igen Überlappung der Peaks. Ab einer Auflösung von 1,5 spricht man von Basislinientrennung. Mit Einführen der Bodenzahl, der Selektivität und der Retentionsfaktoren kann Gleichung 5 in die Fundamentalgleichung der Chromatographie umgewandelt werden (Gleichung 6) [5]:

Selektivitäts- term	Reten- tions- term	Effi- zienz- sterm
------------------------	--------------------------	--------------------------

$$R_s = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) * \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) * \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Gleichung 6

Die Auflösung kann durch drei Faktoren beeinflusst werden:

Der Selektivitätsterm hat den stärksten Einfluss auf die Auflösung, kann aber in der Regel nur durch Wechsel der stationären und/oder mobilen Phase verändert werden. Der Retentionsterm hat einen schwächeren Einfluss, ist dafür aber leicht zu vergrößern. Die Erhöhung des Retentionsfaktors hat eine Erhöhung der Analysenzeit zur Folge. Dies ist oft unerwünscht. Eine Vergrößerung des Effizienzterms und somit der Bodenzahl kann ebenfalls zu einer Verbesserung der Trennung führen. Da die Bodenzahl proportional zur Länge der Säule ist, führt eine Verlängerung der Säule zu einer höheren Auflösung. Eine Vervielfachung der Trennstrecke führt jedoch nur zu einer Verdoppelung der Auflösung (\sqrt{N}). Zudem kommt es durch die Verlängerung der Säule zu einem Anstieg des Gegendrucks und zu einer längeren Analysenzeit.

Der Flusswiderstand von dem Eluenten beim Durchfließen der Säule ist ein begrenzender Faktor für jedes HPLC-System. In der Regel sind die Systeme auf einen Maximaldruck von 400 bar ausgelegt. Moderne Anlagen (UHPLC engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) bieten die Möglichkeit sehr lange Säulen mit einem Gegendruck von bis zu 1300 bar einzusetzen. Im Vergleich zu einem HPLC-System bei 400 bar kann die Säulenlänge bei Verwendung der UHPLC bei 1000 bar so verlängert werden, dass eine Erhöhung der Bodenzahl um 41 % erreicht wird [6]. Das primäre Einsatzgebiet für solchen Anlagen sind jedoch sehr schnelle Analysen mit hohen Flüssen. Hierbei kann die Analysenzeit deutlich verkürzt werden.

Der Eluentenfluss hat einen direkten Einfluss auf die Bodenzahl und somit auf die Auflösung. Um diesen Einfluss zu erklären, müssen drei Effekte betrachtet werden, die zur Peakverbreiterung führen:

Der erste Effekt ist die Eddy-Diffusion (Abbildung 3 A). Infolge verschieden langer Wege der Analytmoleküle durch die gepackte Säule wird zum Durchqueren der Säule eine unterschiedliche Zeit benötigt [7]. Dieser Effekt ist unabhängig von der Fließgeschwindigkeit. Einen starken Einfluss auf die Peakverbreiterung haben die Partikelgröße und die Beschaffenheit der Partikel. Je kleiner und gleichmäßiger die Partikel

des Packungsmaterials sind, desto geringer wird der Beitrag der Eddy-Diffusion zur Peakverbreiterung. Als optimale Form gelten komplett sphärische Partikel [8].

Als longitudinale Diffusion wird die ungeordnete Molekülbewegung der Analyten in MP und SP beschrieben (Abbildung 3 B). Die longitudinale Diffusion ist abhängig von der Aufenthaltsdauer der Analyten in der Säule und vom Diffusionskoeffizienten und somit von der Temperatur. Mit steigendem Fluss sinkt die Aufenthaltszeit der Analyten in der Säule und somit auch der Beitrag der longitudinalen Diffusion zur Peakverbreiterung [7]. Anders als in der GC hat dieser Term in der HPLC aufgrund wesentlich kleineren Diffusionskoeffizienten nur einen geringen Einfluss. Trotzdem kann auch dieser Term beeinflusst werden, in dem die Zwischenräume noch kleiner und gleichmäßiger gestalten werden [9]. Auch hierfür sind kleine, identische Partikel notwendig [9].

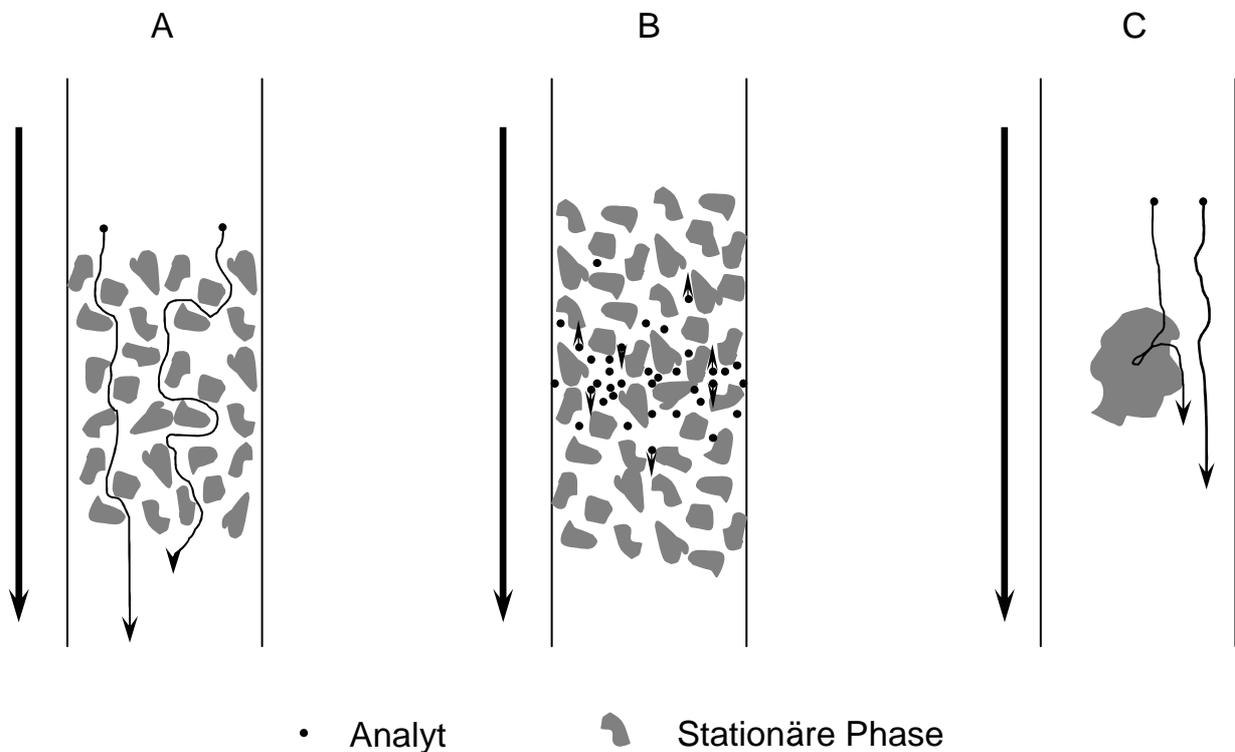


Abbildung 3: Faktoren der Peakverbreiterung in der Flüssigchromatographie. A: Eddy-Diffusion, B: longitudinale Diffusion, C: Massentransporteffekte

Die Massentransporteffekte beschreiben den Transport der Analyten zwischen der mobilen und stationären Phase (Abbildung 3 C) und können auch wie die longitudinale und Eddy-Diffusion durch kleinere Partikel der stationären Phase reduziert werden.

Als Qualitätsmerkmal für ein Trennsystem wird die theoretische Bodenhöhe in Abhängigkeit zur Flussgeschwindigkeit (u) betrachtet.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Gleichung 7

Die Gleichung 7 wird als van-Deemter-Gleichung bezeichnet [7]. Beim Auftragen der Bodenhöhe gegen die Fließgeschwindigkeit kommt es zur Bildung eines Plateaus bei minimaler Bodenhöhe (Abbildung 4). Bei dieser Fließgeschwindigkeit wird bei einem gegebenen System die beste Trennung erreicht.

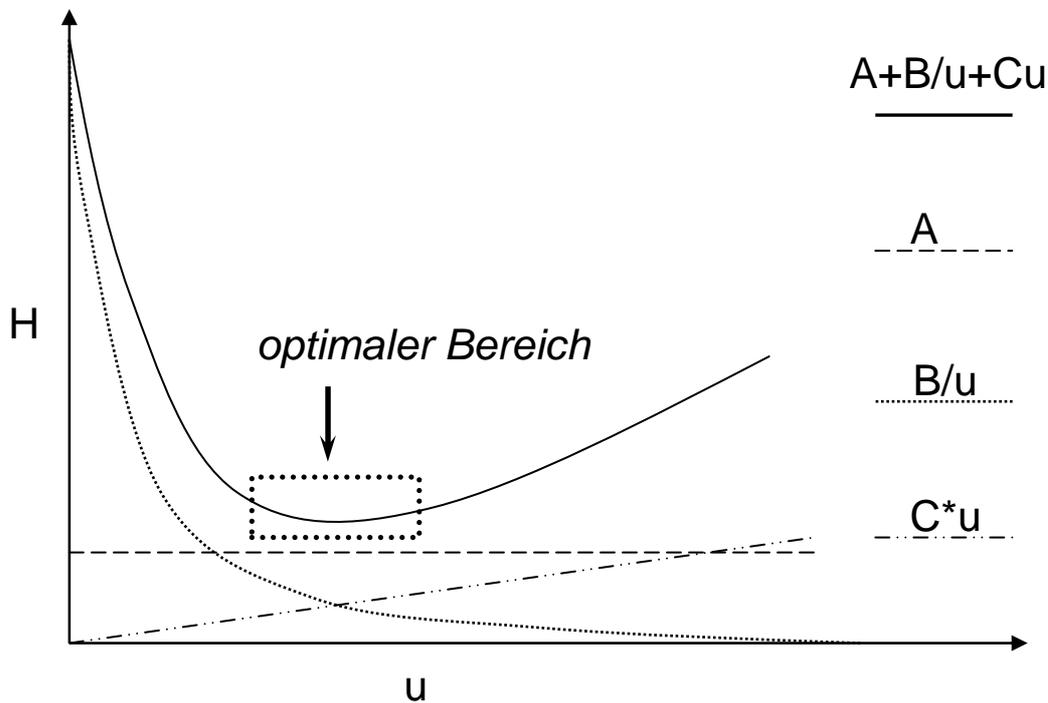


Abbildung 4: Kurvenverlauf der van-Deemter-Gleichung und die einzelnen Beiträge zur Peakverbreiterung in der Flüssigchromatographie: Eddy-Diffusion (A), longitudinale Diffusion (B), Massentransporteffekte (C).

Die Bodenhöhe kann durch die Verwendung von kleineren Partikeln in der stationären Phase verringert werden. Dem entgegen steht der deutliche Anstieg des Flusswiderstands der Säule. Die Verwendung von UHPLC-Systemen erlaubt den Einsatz von sehr kleinen Partikeln. So resultiert der Einsatz von Partikeln unter $2 \mu\text{m}$, vor allem aufgrund des C-Terms, in eine deutliche Steigerung der Effizienz der Trennung. Die Reduzierung des Einflusses der Massentransport-Effekte erlaubt die Analyse das Betreiben von Säulen bei höheren Fließgeschwindigkeiten ohne merklichen Verlust der Effizienz [10].

Partikel mit einem festem Kern (engl. *core shell particle*), die nur einen Mantel aus porösen Material haben, zeigen einen deutlichen Vorteil [11]. Die Größenverteilung der Partikel ist in

der Regel sehr einheitlich [11], sodass die Eddy-Diffusion [12] und longitudinale Diffusion kleiner [9] sind. Die geringe mögliche Eindringtiefe reduziert in erste Linie jedoch den C-Term [8, 11]. Der daraus resultierende Vorteil eines solchen Materials gegenüber normalen sub 2 μm Partikeln ist der geringere Druckwiderstand und die geringere Anfälligkeit der Säulen zu verstopfen.

Neben der Eddy- und longitudinale Diffusion und der Massentransporteffekten entsteht eine zusätzliche Verbreiterung der Peaks durch Effekte, die außerhalb der Säule auftreten [3]. Als erstes ist die Peakverbreiterung in den Verbindungskapillaren zu nennen. Bei Kapillaren mit kleinen Innendurchmessern ist dafür hauptsächlich das parabolische Strömungsprofil der laminaren Strömung verantwortlich. Dieses Strömungsprofil entsteht durch unterschiedliche Geschwindigkeiten in einem Rohr oder einer Kapillare. In der Mitte ist die Geschwindigkeit höher, da dort der Reibungswiderstand geringer ist (Abbildung 5) [13]. Das parabolische Strömungsprofil wird mathematisch durch die Gleichung 8 beschrieben:

$$u(r) = \frac{\Delta P}{4L\mu} (R^2 - r^2) \quad [13].$$

Gleichung 8

Dabei ist ΔP der Druckabfall in der Kapillare, L die Kapillarelänge, μ der Viskositätskoeffizient des Lösungsmittels und R der Kapillarradius. Die Geschwindigkeit $u(r)$ des Lösungsmittels in der Kapillare ist abhängig von der Entfernung r zum Zentrum der Kapillare. Je weiter der Eluent von der Mitte der Kapillare entfernt ist, desto langsamer bewegt er sich im Vergleich zu dem Eluat in der Kapillarmitte.

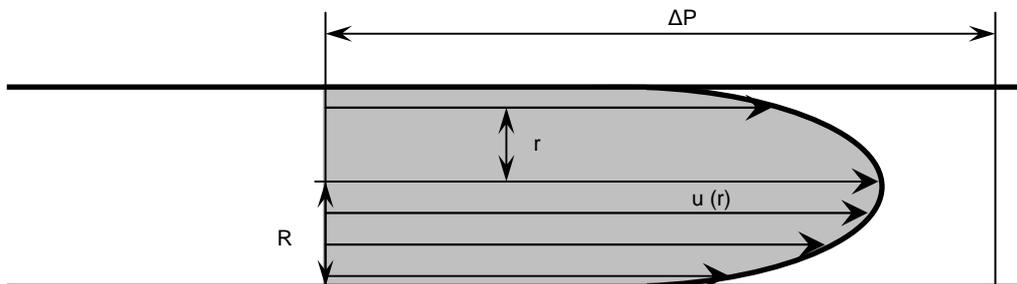


Abbildung 5: Laminare Rohrströmung [13]

Durch die Verwendung von schmäleren Kapillaren kann dieser Effekt verringert werden. Vollständig eliminiert werden, konnte er jedoch nicht.

Auch die Injektion und die Detektion können zur Peakverbreiterung beitragen. Beim Detektor ist zu beachten, dass kein Totvolumen vorhanden ist und die Datenaufnahmerate möglichst hoch und die Messzelle klein sind.

Ein großes Injektionsvolumen führt unmittelbar zu breiteren Peaks. Diesem Effekt kann entgegen gewirkt werden, indem die Probe in einem Lösungsmittel mit schwacher Elutionskraft gelöst wird. Die Probe wird dadurch am Anfang der Säule aufkonzentriert und der chromatographische Vorgang beginnt erst mit steigender Elutionskraft des Laufmittels [14]. Ist dagegen die Probe in einem Lösungsmittel mit höherer Elutionskraft gelöst, werden die Analyten nicht oder nur wenig am Säulenanfang fokussiert. Dies kann zu einem deutlichen Verlust der Trennung führen.

2.1.1.1 Peakkapazität

„Resolving power is what it is all about in analytical separation science“ [15]. Mit dieser Aussage brachte Poppe es auf den Punkt: „Das Auflösungsvermögen ist das, warum es bei der Trennung in der analytischen Chemie geht.“[15]. Diese Aussage trifft nicht nur für die chromatographischen Trennungen, sondern auch auf andere Gebiete der analytischen Chemie zu, wie zum Beispiel auf die Spektroskopie oder die Massenspektrometrie. Das Auflösungsvermögen kann beschrieben werden als maximale Anzahl der getrennten Peaks in einem Analysenlauf oder die minimale Distanz zwischen zwei basisliniengetrenten Peaks [15]. In der Chromatographie beschreibt die Peakkapazität die theoretische Anzahl der getrennten Peaks pro definierte Zeiteinheit.

In den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde ein Konzept aufgestellt, in dem die maximale Trennleistung anhand der errechneten Bodenzahl N ermittelt werden kann [16]. Im Fall der isokratischen Elution kann die Berechnung der Peakkapazität n_{iso} nach Vivó-Truyols et. al. erfolgen [17].

$$n_{iso} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4R_S} \ln\left(\frac{1+k_w}{1+k_a}\right)$$

Gleichung 9

Darin ist R_S die gewünschte Auflösung (im Normalfall beträgt diese 1,0 [17]) k_a und k_w sind die Retentionsfaktoren der ersten und der letzten Komponente.

In vielen Fällen, sowie auch bei dieser Arbeit, wird bei der chromatographischen Trennung ein Gradient verwendet. Im Idealfall sind dabei die Peakbreiten während der gesamten

Analysenzeit konstant [18]. Dem entsprechend verändert sich die Gleichung zur Berechnung der Peakkapazität unter Verwendung eines Gradienten n_{grad} [17]:

$$n_{grad} = \frac{t_G \sqrt{N}}{t_d 4R_s (1 + k_e)} = \frac{t_G}{4R_s \sigma}$$

Gleichung 10

Die Gradientenzeit t_G beschreibt die Zeit zwischen dem ersten Peak, in der Regel die Totzeit, und dem letzten Peak. Der Retentionsfaktor im Moment der Elution k_e beinhaltet die Elutionskraft des Gradienten zur Zeitpunkt der Detektion und ist lösungsmittelabhängig [17]. Eine Vereinfachung kann durch Verwendung der Peakbasisbreiten erreicht werden [19]. Das Verhältnis der Gradientenzeit zu der mittleren Peakbasisbreite w_b (4σ) gibt die Peakkapazität n_{grad} einer eindimensionalen Trennung an, wenn die gewünschte Auflösung 1,0 beträgt (Gleichung 11) [19].

$$n_{grad} = \frac{t_G}{w_b}$$

Gleichung 11

Bei dieser Formel handelt es sich um eine Näherung, sie erlaubt aber eine relativ schnelle Berechnung der Peakkapazität mit experimentell leicht zugänglichen Daten. In dieser Arbeit wurden die Peakkapazitäten der eindimensionalen Analysen mit dieser Formel berechnet.

2.1.2 Multidimensionale HPLC

Die klassische, eindimensionale Flüssigchromatographie stellt eine gute Methode zur Trennung einfacher Stoffgemische dar. Im Falle ungenügender Selektivität einer einzelnen Phase können mehrere Phasen, unterschiedlicher Selektivität, hintereinander geschaltet werden [20]. Die Trennleistung ist jedoch oftmals nicht ausreichend für komplexe Proben, wie z.B. Naturprodukte mit vielen verschiedenen Substanzklassen. Mit der Entwicklung multidimensionaler Trenntechniken besteht nun die Möglichkeit, deutlich mehr Substanzen voneinander zu trennen und Matrixeffekte (z.B. Ionensuppression bei massenspektrometrischer Detektion) zu reduzieren [21].

Es gibt zwei Arten der zweidimensionalen Flüssigchromatographie [22]:

Zum einen die „heart-cut“ – Techniken, in denen eine oder einige wenige Fraktionen aus der ersten Dimension auf eine zweite Dimension gegeben werden [23, 24].

Die andere Technik wird als „komprehensiv“ bezeichnet. In der Flüssigchromatographie wird diese mit LC x LC abgekürzt. Bei einer komprehensiven Technik müssen folgende drei Kriterien erfüllt sein [21]:

1. Jeder Teil der Probe muss zwei verschiedene Trennmechanismen durchlaufen (Orthogonalität).
2. Alle Komponenten müssen beide Säulen ohne Verluste oder zu gleichen Teilen passieren und den Detektor erreichen.
3. Die Trennung und Auflösung der ersten Dimension muss in der zweiten Dimension erhalten bleiben.

Ein wichtiger Vorteil von komprehensiven Techniken gegenüber LC - LC ist die Beibehaltung der erzielten Trennung aus der ersten Dimension. Während in der LC - LC zwei bereits getrennte Analyten wieder koeluiieren können, ist dies in der LC x LC nicht möglich. Im Vergleich zur „heart-cut“ – Techniken liefert die LC x LC wesentlich umfassendere Informationen, da jeder Teil des Eluats aus der ersten Dimension auch die zweite Dimension passiert.

Die erste Anwendung der komprehensiven zweidimensionalen Chromatographie liegt weit zurück. Vor beinahe 70 Jahren wurde die erste zweidimensionale dünnschichtchromatographische Trennung präsentiert [25]. Hierbei wurde die Dünnschichtplatte, nachdem diese mit dem ersten Lösungsmittel entwickelt wurde, getrocknet, um 90° gedreht und mit dem zweiten Lösungsmittel nochmals entwickelt. Als Beispiel für ein Chromatogramm der DC x DC ist hier die Analyse von 23 Mononucleotiden aus dem Jahr 1963 gezeigt [26] (Abbildung 6).

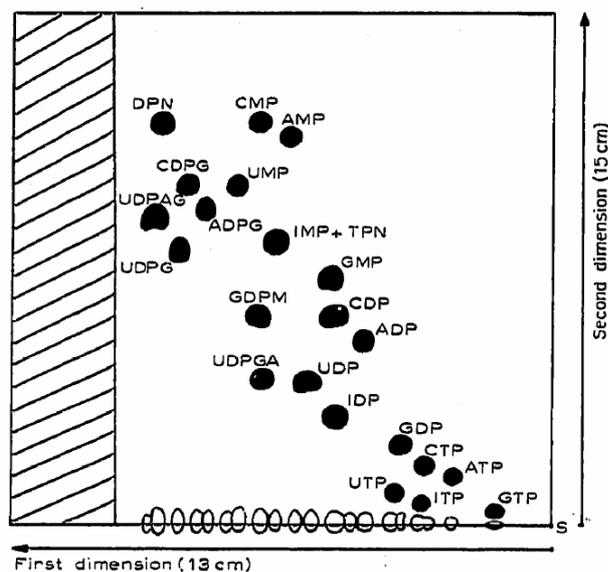


Abbildung 6: Zweidimensionale DC-Analyse von 23 Ribonucleotiden [26]

Zwanzig Jahre später wurden bereits zahlreiche comprehensive zweidimensionale dünnschichtchromatographische Methoden (DC x DC) ausgearbeitet und publiziert [27 - 30]. Dieses Beispiel belegt die hohe Trennleistung von zweidimensionalen Analysen. So lag es nahe, dieses Prinzip auf weitere Trennmethoden auszuweiten. Die Übertragung auf die säulenbasierte Chromatographie war jedoch schwierig. In der Flüssigchromatographie wurde zuerst die off-line Methode entwickelt [31]. Die Grundidee bestand darin, zunächst eine Trennung der Probe auf der ersten Säule durchzuführen und das Eluat in Fraktionen aufzusammeln. Anschließend wurden die Fraktionen einzeln auf einer zweiten Säule mit anderer Selektivität nochmals getrennt. Diese Methode wird auch heute noch oftmals angewendet [32, 33].

2.1.3 Comprehensive zweidimensionale HPLC

Grundsätzlich werden comprehensive zweidimensionale HPLC-Techniken (LC x LC) in drei Gruppen unterteilt.

1. On-line comprehensive zweidimensionale HPLC

Die Trennung in der ersten und der zweiten Dimension laufen zur selben Zeit ab [31, 34]. In der vorliegenden Arbeit wird diese Trenntechnik mit LC x LC abgekürzt. Mit dieser Methode ist es möglich, in der gleichen Zeit eine deutlich höhere Trennleistung zu erzielen, als mit der voll optimierten eindimensionalen HPLC [35].

2. Off-line comprehensive zweidimensionale HPLC

Das Eluat der ersten Dimension wird fraktioniert und zeitversetzt in die zweite Dimension injiziert [33, 36, 37].

3. Stop-and-go comprehensive zweidimensionale HPLC.

Die Trennung in der ersten Dimension wird periodisch gestoppt. In dieser Zeit erfolgt die Trennung auf der zweiten Säule [38 - 40].

Die ersten Ergebnisse zur comprehensiven zweidimensionalen on-line LC x LC veröffentlichten 1978 Erni und Frei [41]. Die Idee bestand darin zwei Säulen der Flüssigchromatographie zu koppeln, sodass die Analyten eines Stoffgemisches auf zwei unterschiedlichen stationären Phasen getrennt werden können. Erni und Frei verwendeten dazu in der ersten Dimension eine Gelpermeationssäule und in der zweiten Dimension eine Umkehrphase [41]. Das Innovative war dabei die Verbindung der beiden Säulen mit einem Acht-Wege-Ventil. So konnte die Fraktionierung des Eluats und die Injektion der Fraktionen mit derselben Vorrichtung und zum selben Zeitpunkt durchgeführt werden. Bis heute hat sich

an diesem Prinzip nichts geändert. Die Schaltung erfolgt jedoch in der Regel mit einem Zehn-Wege-Ventil, das zusätzliche Vorteile mit sich bringt [42].

Eine LC x LC-Anlage besteht aus zwei einzelnen HPLC Systemen, die miteinander über einen Modulator (z.B. Zehn-Wege-Ventil) verbunden sind. Im ersten Schritt erfolgt die Trennung der Probe auf der ersten Dimension. Der Modulator erlaubt die Fraktionierung des Eluats der ersten Dimension und die gleichzeitige Injektion der Fraktionen in die zweite Dimension. Das Eluat der ersten Dimension wird dabei abwechselnd in einer der beiden Schleifen des Modulators gesammelt bzw. daraus injiziert. Eine typische Systemanordnung und die Funktionsweise sind in Abbildung 7 gezeigt.

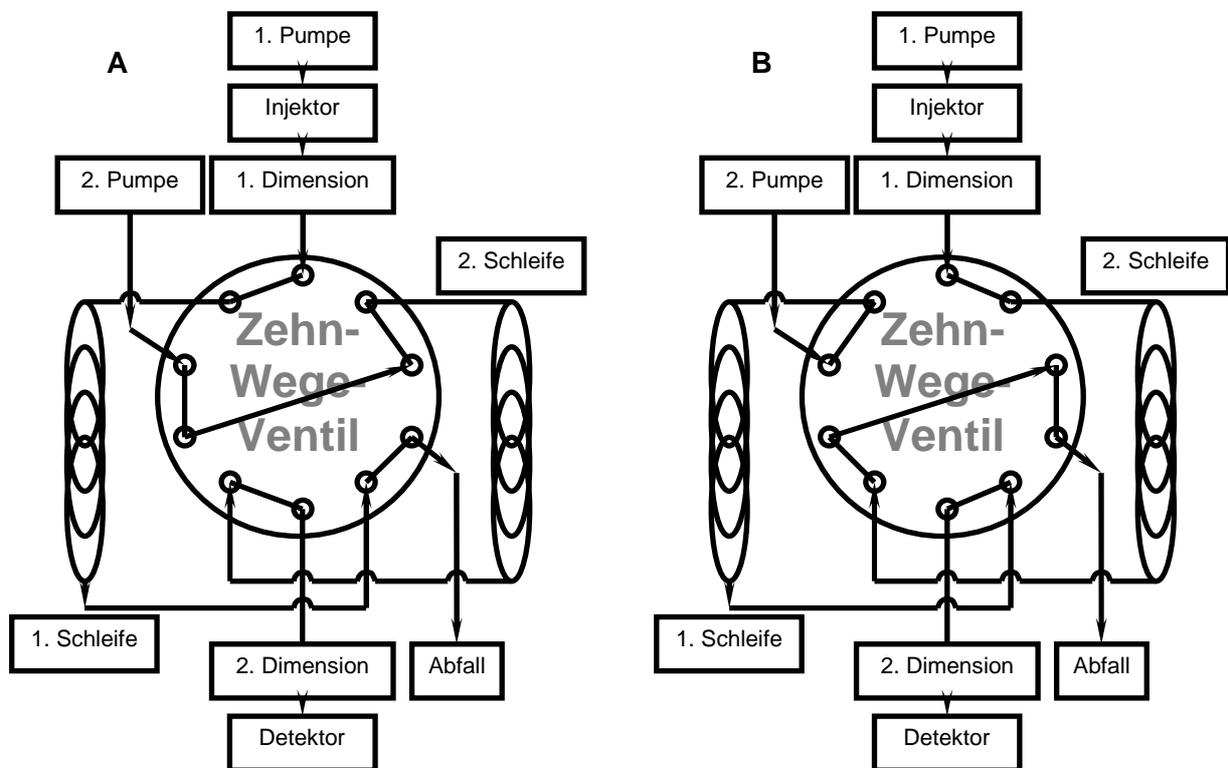


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines on-line LC x LC-Systems. Die erste und zweite Dimension sind über ein Zehn-Wege-Ventil verbunden. In der Position A erreicht das Eluat der ersten Dimension über das Ventil die erste Schleife. Nach dem Schalten des Ventils in Position B wird das gesammelte Eluat mit Hilfe der zweiten Pumpe in die zweite Dimension überführt und dort einer erneuter Trennung unterzogen. Gleichzeitig wird das Eluat der ersten Dimension in der zweiten Schleife gesammelt. Nach erneutem Schalten in die Position A wird das gesammelte Eluat aus der zweiten Schleife in die zweite Dimension überführt und der Prozess beginnt von vorne.

Die Modulation kann mit unterschiedlichen Ventilen und Ventilkombinationen durchgeführt werden [43]. Das Wesentliche einer Modulation ist immer gleich: die Fraktionierung des Eluats, kurze Lagerung und die Injektion der Probe in die zweite Dimension. Während der Lagerung der Fraktionen in den Schleifen kommt es zur Rückmischung innerhalb der Fraktion und bei der anschließenden Injektion wird die gesamte Fraktion auf die zweite Säule

als homogene Probe aufgegeben. Somit reduziert die Modulation die Trennleistung der ersten Dimension. Aus diesem Grund ist streng genommen die LC x LC keine comprehensive Methode wie es im Abschnitt 2.1.2 unter Punkt 3 dargestellt ist. Bei der DC x DC handelt es sich dagegen um eine comprehensive Methode ohne Einschränkungen, denn die in der ersten Dimension erhaltene Trennung bleibt unverändert bestehen.

Der Verlust der Trennleistung bei der Rückmischung während der Fraktionierung des Eluats aus der ersten Dimension und der Injektion in die Zweite kann quantifiziert werden und wird als Verbreiterungsfaktor des Peaks durch die Modulation $\langle \sigma^* \rangle$ beschrieben [44]. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass eine kürzere Sammelzeit die Verbreiterung reduziert [45, 46]. Der Verbreiterungsfaktor lässt sich nach Davis et. al. [47] und Gu et. al. [48] wie folgt berechnen

$$\langle \sigma^* \rangle = \sqrt{1 + 0,21 \left(\frac{P_M}{\sigma} \right)^2} \quad \text{oder} \quad \langle \sigma^* \rangle = \sqrt{1 + 3,35 \left(\frac{P_M}{w_b} \right)^2}$$

Gleichungen 12 und 13

wobei P_M die Dauer der Sammelphase ist. So lässt sich der Verbreiterungsfaktor, ausgehend von der Standardabweichung σ oder der Peakbasisbreite w_b der ersten Dimension, berechnen. Die Peakbasisbreite w_b ($w_b = 4\sigma$ beschreibt 95,5 % des Peaks) darf dabei nicht mit der tatsächlichen Peakbreite verwechselt werden. Diese ist größer und wird in der Regel mit 6σ (99,7 %) angenommen [45].

Die Verringerung der Peakkapazität durch die Modulation kann mit dem Nobuofaktor n_F beschrieben werden. Der Nobuofaktor entspricht dem Kehrwert des Verbreiterungsfaktors. Durch die Multiplikation der Peakkapazität der ersten Dimension mit dem Nobuofaktor wird die reduzierte bzw. tatsächliche Peakkapazität der ersten Dimension erhalten [47]. Bei einem Sammelzyklus mit der Dauer von einer Standardabweichung des gaußförmigen Peaks beträgt der Verbreiterungsfaktor 10 % und der Nobuofaktor ca. 0,94 [49]. Wenn jedoch die Sammelzeit zwei Standardabweichungen beträgt, kommt es zu einer Peakverbreiterung von 30 [50] bis 36 % [47]. Dadurch sinkt der Nobuofaktor auf 0,80. In Abbildung 8 ist die Abhängigkeit des Nobuofaktors von der Modulationsperiode P_M/σ gezeigt [44].

In der Regel wird eine Sammelzeit von bis zu zwei σ angestrebt. Dies entspricht drei bis vier Fraktionen pro Peak der ersten Dimension (Abbildung 9). Dieses Vorgehen ist bei der on-line LC x LC ein Kompromiss zwischen Modulationszeit und Analysenzeit der zweiten Dimension.

Abhängigkeit des Nobuofaktors von der Dauer der Sammelzeit

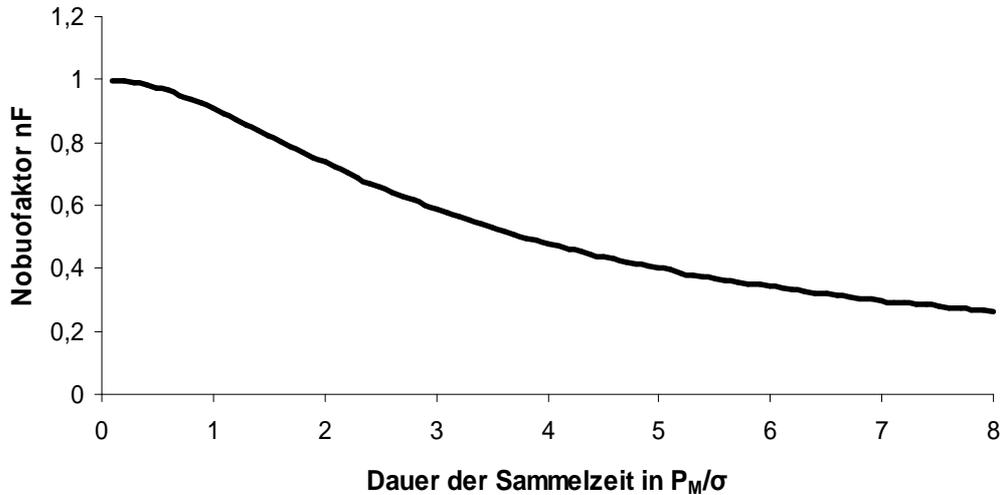


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Abhängigkeit des Nobuofaktors n_F von der Modulationsperiode P_M/σ [44], berechnet nach [48]

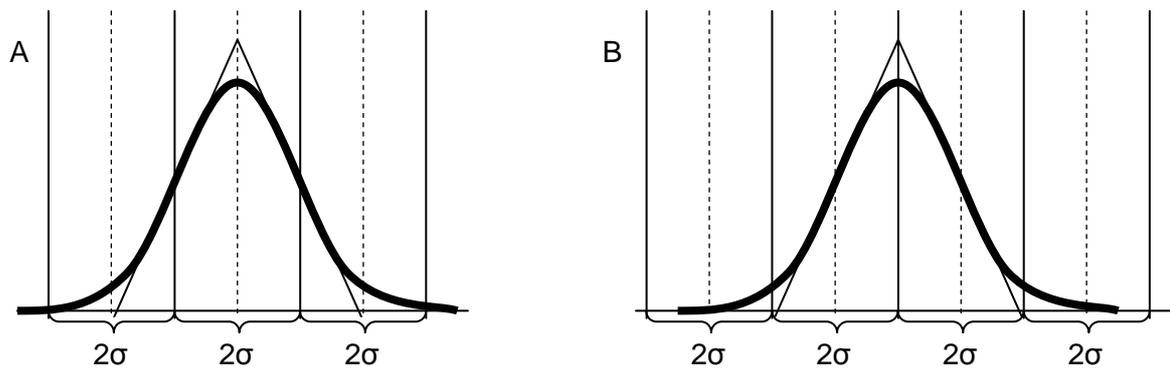


Abbildung 9: Fraktionierung des Gaußpeaks mit der Modulation von 2σ . Es können so drei bis vier Fraktionen gebildet werden. A: Fraktion in Peakphase $\varphi = 0$. Peak wird in drei Fraktionen unterteilt. B: Fraktion in der Peakphase $\varphi = 0,5$. Peak wird in vier Fraktionen unterteilt. Die Phase des Peaks (φ) kann die Werte von 0 bis 1 annehmen [50].

Bei der on-line LC x LC entspricht die Sammelzeit der Fraktionen der Analysenzeit in der zweiten Dimension. Eine Verkürzung der Sammelzeit bedeutet eine Verkürzung der Analysenzeit in der zweiten Dimension. Grundsätzlich lassen sich mit einer längeren Analysenzeit höhere Trennleistungen erzielen [51]. Um dennoch eine hohe Trennleistung in der zweiten Dimension in der kurzen Sammelzeit zu realisieren, können zwei gleiche Säulen in der zweiten Dimension eingesetzt werden, um so die Analysenzeit in der zweiten Dimension zu verdoppeln [52 - 54]. Trotzdem muss die Analyse in der zweiten Dimension möglichst kurz sein. Eine Beschleunigung der Elution kann durch Erhöhen der Flussrate der

mobilen Phase erreicht werden. Dadurch werden aber höhere Anforderungen an die Säulen bzw. das Säulenmaterial und an das HPLC-System gestellt. Diese Problematik wird in Abschnitt 4.1.1 genauer dargestellt.

Um die Reproduzierbarkeit einer on-line LC x LC-Methode zu beurteilen, muss noch ein anderer Aspekt, nämlich die Vollständigkeit der Fraktionen bei der Fraktionierung, berücksichtigt werden [47, 50]. Wenn das Volumen des Eluats das Volumen der Probeschleifen übersteigt, geht ein Teil der Probe verloren. Der gleiche Effekt ist zu beobachten, wenn die Modulation nur mit einer Schleife durchgeführt wird [38, 55]. In diesem Zusammenhang ist es auch wichtig, die Phase (φ) der Fraktionierung zu betrachten (Abbildung 9). Die Phase beschreibt, zu welchem Zeitpunkt im Verhältnis zum Peak die Fraktionierung beginnt. Wenn die Sammelzeit eine Peakbreite (6σ) beträgt, kann der Peak in extremen Fällen entweder vollständig in einer Fraktion oder zu gleichen Teilen in zwei Fraktionen aufgeteilt sein. Im zweiten Fall würde der Peak im Vergleich zum ersten Fall, doppelt so breit sein. Werden die Fraktionen nicht vollständig übertragen, wird der Analytverlust bei der Fraktionierung deshalb nicht vergleichbar. Daher ist es unverzichtbar, die Sammelzeit der Fraktionen zu optimieren. Denn erst ab vier Modulationen pro Peak, also bei zwei Standardabweichungen (2σ), wird die Übertragung gleichmäßig und die Phase der Modulation spielt beim Verlust der Analyten durch die Fraktionierung keine Rolle mehr [45]. Das Probevolumen und die Elutionskraft der Probelösung muss ebenfalls berücksichtigt werden. Die gesamte Fraktion der ersten Dimension wird in die zweite Dimension übertragen. Mit Erhöhung des Fraktionsvolumens und somit auch des Injektionsvolumens in der zweiten Dimension sinkt die Trennleistung in der zweiten Dimension [56]. Hat der eingesetzte Eluent in der ersten Dimension eine starke Elutionskraft in der zweiten Dimension, kann es zu weiteren Einbußen der Effektivität der Trennung kommen. Dies macht grundsätzlich die Kopplung von NP mit RP problematisch. Indem die Fraktionen sehr klein gehalten werden, kann die Kopplung von NP x RP dennoch realisiert werden [43, 57, 58]. Eine andere Möglichkeit ist die Entfernung des organischen Lösungsmittels aus dem Eluat, indem das Eluat im Vakuum eingedampft wird [59, 60]. Dadurch kommt es zusätzlich zur Reduzierung des Fraktionsvolumens und somit zur Fokussierung in der zweiten Dimension. Eine andere Möglichkeit die Modulation mit Fokussierung durchzuführen, ist die Anreicherung und die thermische Mobilisierung der Analyten an Graphit [61].

Die zweidimensionale Darstellung erfolgt, indem das eindimensionale Chromatogramm in gleiche Zeitabschnitte, entsprechend der Modulationszeit, unterteilt wird und diese dann nebeneinander angeordnet werden (Abbildung 10 A-C). Die Intensität der Peaks kann

entweder durch unterschiedlich große Flächen der Peaks [62] (Abbildung 10 C) oder durch farblichen Abstufungen (Abbildung 10 D) dargestellt werden [63]. Werden die Peaks, die zu einem Analyten gehören, zusammengefasst, spricht man von Spots (Abbildung 10 D).

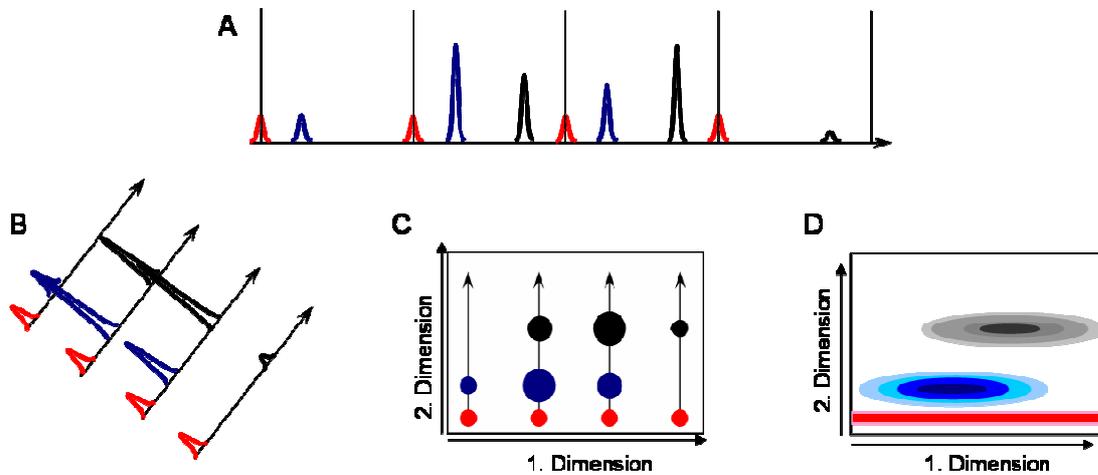


Abbildung 10: Erstellung eines zweidimensionalen Chromatogramms: A: Eindimensionale Darstellung des zweidimensionalen Chromatogramms; B: Zuschnitt des Chromatogramms in gleiche Abschnitte; C: Vereinfachte Darstellung eines zweidimensionalen Chromatogramms; D: Spotdarstellung eines zweidimensionalen Chromatogramms; Rot: Systempeak; Schwarz Analyt a, Blau: Analyt b.

2.1.3.1 Orthogonalität

Die verschiedenen Retentionsmechanismen in der ersten und zweiten Dimension beeinflussen die Trennleistung einer zweidimensionalen Methode entscheidend. Je unterschiedlicher die beiden Trennmechanismen sind, desto besser wird die Trennleistung. Bei völliger Unabhängigkeit der Retentionsmechanismen spricht man von einer orthogonalen Trennung. Diese wird jedoch nur in Ausnahmefällen erreicht [64]. In der Praxis besteht immer eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Korrelation der Retentionsmechanismen, sodass eine Größe eingeführt werden muss, die den Grad der Unabhängigkeit der Trennmechanismen beschreibt. Diese Größe wird Orthogonalität (O) genannt [65].

Die nicht vollkommen unabhängigen Trennmechanismen in beiden Dimensionen führen dazu, dass nicht das gesamte Leistungsvermögen des Systems ausgenutzt wird [66]. Die Anordnung der Analyten in einem zweidimensionalen Chromatogramm folgt in diesem Fall einer Geraden. Die Korrelation kann direkt oder umgekehrt sein (Abbildung 11) [67]. Bei einer direkten Korrelation handelt es sich im Extremfall um zwei identische Trennmechanismen wie z.B. RP18 x RP18, die mit dem gleichen Eluenten betrieben werden. Eine umgekehrte Korrelation besteht, wenn zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt werden, bei denen die Trennung aufgrund der gleichen Eigenschaft des Analyteigenschaft erreicht werden soll. Als

Beispiel kann hier die Kopplung von NP mit RP genannt werden. Die polaren Analyten eluieren langsam auf der Normalphase und schnell auf der Umkehrphase. Umgekehrt verhält es sich mit den unpolaren Substanzen. Die Retention der unpolaren Komponenten auf RP ist hoch und auf NP gering. Beide Trennmechanismen sind mehr oder weniger abhängig von der Polarität des Analyten [67].

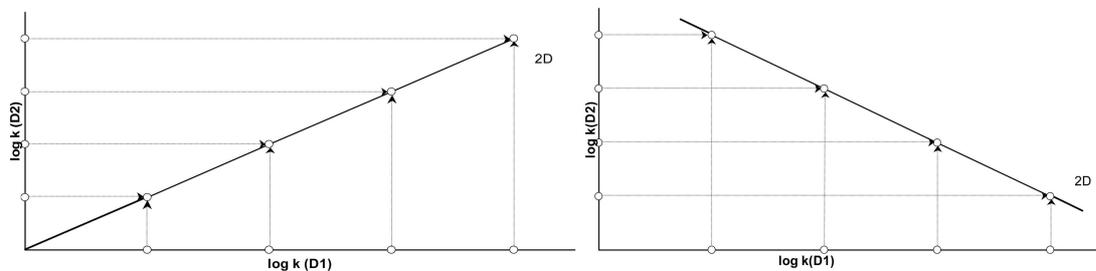


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Trennung der ersten und der zweiten Dimension als Logarithmus der Retentionsfaktoren ($\log k$). Links: Vollkommene Übereinstimmung der Trennmechanismen. Rechts: Umgekehrte vollständige Übereinstimmung der Trennmechanismen [67].

Beide Fälle sind unerwünscht, da dadurch die Vorteile zweidimensionaler Chromatographie minimiert werden. Die Trennmechanismen einer Phase werden jedoch nicht nur durch ihre Polarität, sondern auch durch Silanophilie oder andere polare Wechselwirkungen (wie z.B. π - π -Wechselwirkungen) beschrieben [68]. So kann eine gewisse Orthogonalität auch mit zwei RP18-Phasen [69] oder auch mit Kopplung von NP mit RP [70 - 73] erreicht werden.

Die theoretische Vorhersage der Orthogonalität für eine Säulenkombination ist schwierig. Eine mögliche Beschreibung der Orthogonalität wurde von Slonecker et. al. gezeigt [74]. Anhand der Retention von bis zu 46 Standardanalyten in einer eindimensionalen Trennung konnte die Entropie der Verteilung vorhergesagt werden. Die Übertragung solcher Vorhersagen auf reale Analysen ist jedoch nur begrenzt möglich, da die Zusammensetzung der zu analysierenden Probe einen wesentlichen Einfluss auf die Orthogonalität und somit der Peakkapazität hat [75]. Daher sollte die Orthogonalität eines Systems mit der zu analysierenden Probe bestimmt werden. Diese Problematik wird in den Kapiteln 4.1.1.1 und 4.2.1 näher beschrieben.

2.1.4 Recycling Chromatographie

Unter Recycling-HPLC versteht man ein Verfahren, bei dem das Eluat nach Verlassen der Säule wieder auf dieselbe Säule gegeben wird [76]. Entscheidend dabei ist, dass die Analyten die Säule mehrmals passieren. So wird die Trennstrecke bei gleich bleibendem Gegendruck

effektiv verlängert. Auf diesem Weg kann eine beliebig lange Säule simuliert werden [77]. Die Länge der Säule ist proportional zu der Bodenzahl [78], somit kann - zu mindest theoretisch - eine beliebig gute Trennung erzielt werden [79].

Es gibt mehrere Möglichkeiten Recycling-HPLC zu betreiben. Die bekanntesten Recyclingsysteme sind CLR (engl. *closed-loop recycling chromatography*) [80] und AP (engl. *alternate pumping recycling chromatography*) [81]. Auch die mit Recyclingmethoden verwandte SMB (engl. *simulated moving-bed chromatography*) [82] wird häufig eingesetzt. Die schematischen Darstellungen von CLR und AP sind in Abbildung 12 gezeigt. Bei beiden Methoden wird eine Verbesserung der Trennung erreicht, indem die Analyten die gleiche Säule bzw. die gleichen Säulen mehrfach passieren. Es bestehen jedoch wesentliche Unterschiede im Aufbau der Systeme.

Eine typische CLR-HPLC-Anlage ist in Abbildung 12 A dargestellt. Recycling-HPLC-Anlagen mit diesem Aufbau werden häufig bei der preparativen HPLC in Verbindung mit der Größenausschlusschromatographie eingesetzt [80]. Zu Beginn befinden sich beide Ventile in der Position 1-2 (nicht gezeigt). Nach der Injektion werden beide Ventile in Position 6-1 gestellt (Abbildung 12 A). In dieser Phase wird der Eluent durch die Pumpe befördert und passiert die Trennsäule und den Detektor. Nach dem zweiten Ventil erreicht das Eluat über das T-Stück den Eingang der Pumpe. Da die Pumpe den gleichen Fluss am Eingang wie am Ausgang benötigt, dringt kein frischer Eluent in das System. Nachdem die gewünschte Trennung erzielt wurde, wird Ventil 2 in Position 1-2 gestellt. Die getrennten Substanzen können so fraktioniert werden.

Der große Nachteil dieses Systems ist die Peakverbreiterung während des Pumpvorgangs [83], sowie eine mögliche Kontamination der Pumpe mit den Analyten. Bedingt durch den hohen Fluss in der preparativen HPLC und dem damit verbundenen positiven Verhältnis von Fluss zu Totvolumen der Pumpe kann die entstehende Peakverbreiterung jedoch vernachlässigt werden. Der Einsatz in der analytischen HPLC ist dagegen problematisch. Die herkömmlichen HPLC-Pumpen haben ein Totvolumen von 100 μL oder mehr. Im Vergleich zu einem Fluss von 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ bei einer Standardsäule (ID 4,6mm x 250 mm) fällt dieses Verhältnis deutlich schlechter aus [84].

Eine Alternative bietet die *alternate-pumping recycling chromatography* (AP) [80]. Grundlegende Bestandteile dieser Methode sind ein Sechs-Wege-Ventil, zwei identische Säulen und zwei Detektoren (Abbildung 12 B). Wenn die Analyten die erste Säule verlassen, gelangen sie über das Ventil in die zweite Säule. Nachdem die Analyten sich in der zweiten Säule befinden, erfolgt die Schaltung des Ventils.

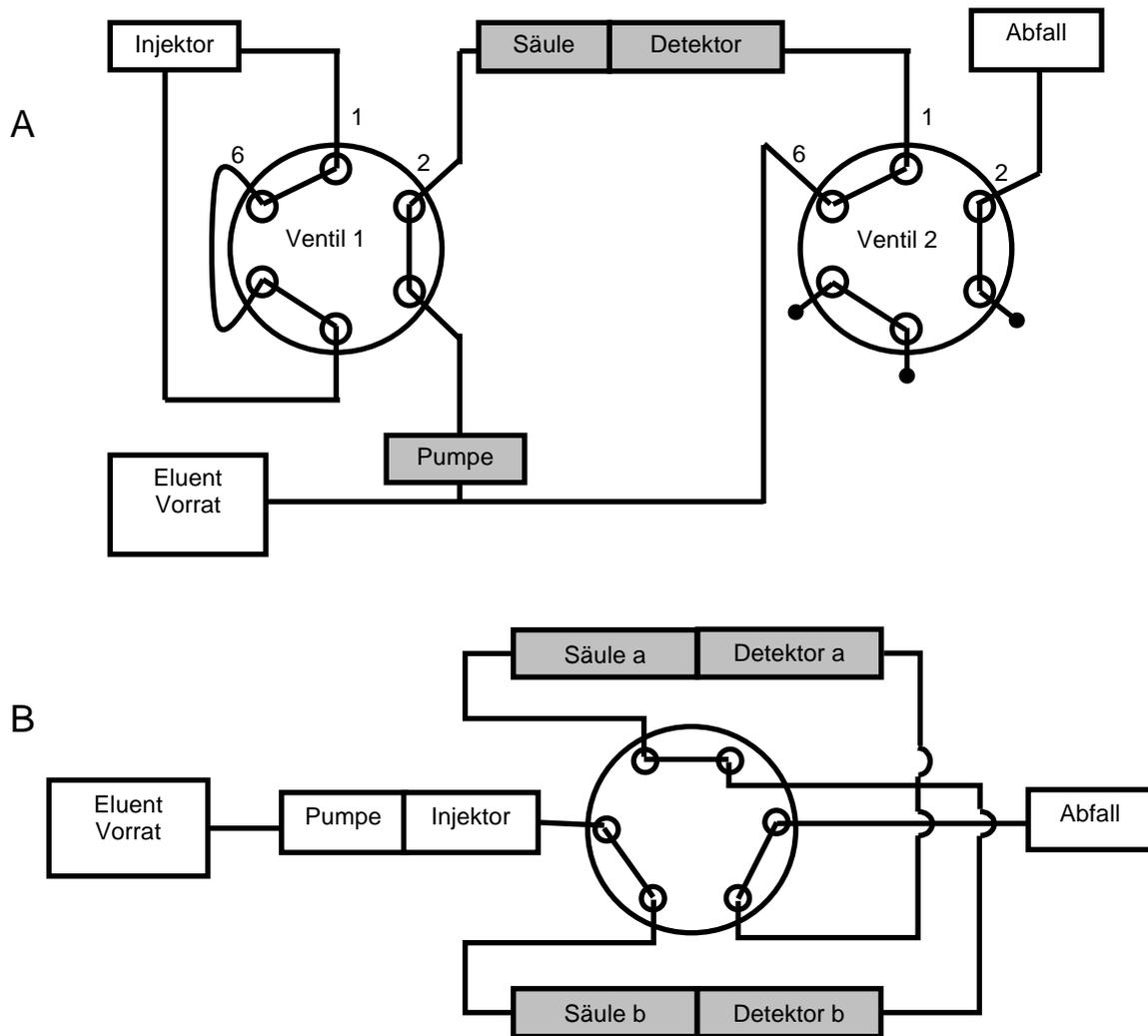


Abbildung 12: A: closed-loop recycling chromatography. B: alternate pumping recycling chromatography

Jetzt wird das Eluat aus der zweiten Säule zurück in die Erste befördert. Dieser Prozess wiederholt sich bis die gewünschte Trennung erreicht ist. Um die rechtzeitige Schaltung zu ermöglichen, wird nach jeder Säule ein Detektor angeschlossen [85]. Bei diesem System wird auf das Durchschleusen der Analyten durch die Pumpe verzichtet und es entsteht keine zusätzliche Peakverbreiterung. Aber auch dieses System hat einige Nachteile. Es werden zwei Säulen und zwei Detektoren benötigt [83]. Bei einer Schaltung mit einem Acht- oder Zehn-Wege-Ventil reicht auch ein Detektor aus [84, 86]. Das Hauptproblem besteht aber in der durch die Schaltung entstehenden Druckschwankung in den Säulen. Zudem wird ein druckstabiler Detektor benötigt, da sich dieser zwischen den Säulen befindet und so ca. die Hälfte des Gesamtgedrucks des Systems erfährt [84].

Beide Systeme haben Vor- und Nachteile. Um die Lücke zwischen diesen beiden Systemen zu schließen, wurde eine neue Methode entwickelt. Sie wird in Abschnitt 4.5 vorgestellt.

2.2 Probenbeschreibung

Die Wahl der zur untersuchenden Proben fiel auf Matcha-Tee, *Radix Angelicae sinensis*, ein pflanzliches Heilmittel aus der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM), und Wein.

2.2.1 Matcha-Tee

Matcha ist ein aus Japan stammender Pulverttee (*Camellia sinensis*), welcher nur auf besonderen Schattenplantagen angebaut wird. Nach der Ernte wird Matcha wie grüner Tee verarbeitet und anschließend mit Hilfe von Granitsteinmühlen vermahlen. Die durchschnittliche Pulvergröße beträgt 5-10 µm [87]. Traditionell wird Matcha-Tee zubereitet, indem ca. 1 g Pulver in eine Matcha Schale gegeben und mit ca. 80 ml heißem Wasser (80 °C) aufgegossen wird. Da der Matcha-Tee im Wasser aufgeschlämmt wird, wird er vollständig getrunken und alle Inhaltsstoffe gelangen in den Körper [88].

Zusätzlich wird in dieser Arbeit auch Sencha-Tee untersucht. Sencha bedeutet gedämpfter Tee und ist der beliebteste grüne Tee Japans. Die verwendeten Teeblätter stammen ebenfalls vom Teestrauch *Camellia sinensis*. Der Tee besteht aus losen Blättern, welche mit heißem Wasser (70 °C) aufgegossen werden. Getrunken wird hierbei nur der wässrige Extrakt [89].

Die vorherrschende Stoffklasse im Tee sind die Polyphenole. Sie liegen frei oder glykosidisch gebunden vor [90]. Die Komplexität der Probe ist durch die Vielfalt der Polyphenole, aber auch durch die Position und Art der gebundenen Zucker gegeben. Dem Tee, insbesondere den darin enthaltenen Catechinen, wird eine Vielzahl gesundheitsfördernder Eigenschaften zugeschrieben [89, 91]. Die Catechine sind in der Regel gut wasserlöslich und geben dem Tee den spezifischen Geschmack [92, 93]. Ein wässriger Extrakt bietet somit ein interessantes Untersuchungsobjekt [33, 94] und erlaubt bei geringer Probenvorbereitung einen einfachen Zugang zu einer komplexen Probe.

Die Identifizierung und die Analyse der Catechine und ebenso von Koffein wurde bereits mit der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie beschrieben [88, 95, 96]. Eine gute Trennung der Inhaltsstoffe von Tee konnte auch mit der HPLC gezeigt werden [97, 98]. Es wurden bis zu 96 phenolische Verbindungen identifiziert. Lin et al. haben jedoch dargelegt, dass bei komplexen Proben selbst eine sehr gute eindimensionale chromatographische Trennung nicht ausreichend ist [99]. Deutliche Vorteile einer zweidimensionalen Trenntechnik konnten bereits bei der Untersuchung von Tee mit DC x DC [100] und mit off-line LC x LC [33] gezeigt werden.

2.2.2 Radix Angelicae sinensis

Radix Angelicae sinensis, in China als Danggui bekannt, ist in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) eine weit verbreitete Heilpflanze. Die Wurzeln dieser Pflanze werden zur Behandlung von Anämie, Verstopfung, Herz-Kreislauf-Erkrankung, Leberfibrose und einer Vielzahl von gynäkologischen Erkrankungen eingesetzt [101]. Zu den wahrscheinlich pharmakologisch wirksamen Substanzen der *Radix Angelicae sinensis* gehören: Ferulasäure, Senkyunolid H, Senkyunolid I und Z-Ligustilid [102, 103]. Des Weiteren ist eine Reihe von Stoffen wie Vanillinsäure, Carvacrol und Guaiacol enthalten, die ebenfalls pharmakologisch wirksam sein sollen [104].

Die Zusammensetzung der Inhaltstoffe kann sich je nach Spezies [105, 106] oder Herkunft der Pflanzen unterscheiden [104]. Die Vielzahl der Komponenten und die Zugehörigkeit der Stoffe zu den unterschiedlichen Stoffklassen macht die Analyse von solchen Proben schwierig. Auch mit einer guten eindimensionalen Analyse können nur einige der Inhaltstoffe identifiziert werden [104]. Bei solch komplexen Proben konnte bereits der große Vorteil der LC x LC gezeigt werden [107, 108].

Radix Angelicae sinensis ist im Vergleich zum Tee als komplexer anzusehen. Es werden noch mehr Stoffklassen erwartet [101], deshalb kann die Leistungsfähigkeit der komprehensiven zweidimensionalen Trenntechniken an solchen Proben besonders gut gezeigt werden.

2.2.3 Weißwein

Wein gehört zu den ersten alkoholischen Getränken in der Menschheitsgeschichte. Die frühesten nachgewiesenen Weinspuren sind über 7000 Jahre alt [109 - 111]. Wein ist ein Getränk, das durch vollständige oder teilweise alkoholische Gärung von frischen, eingemaischten Weintrauben oder von Traubenmost hergestellt wird [112].

Die Herstellung von Weißwein beginnt mit der Pressung der Trauben. Der entstandene Most enthält den Saft des Fruchtfleisches und die extrahierten Stoffe aus den Schalen der Trauben [113]. Im weiteren Prozess erfolgt die Gärung, und damit die Umwandlung der Inhaltstoffe durch die Hefe. Bei der anschließenden Reifung des Weines kommt es zur Bildung weiterer Stoffe, die die Beschaffenheit des Weines weiter definieren. All diese Schritte haben Einfluss auf die Eigenschaften des Weines [112].

Phenole und phenolische Säuren sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet [114 - 116]. Dem Traubensaft geben die phenolischen Komponenten die spezifische Färbung und tragen zum Aroma bei. In der Regel liegen im Saft die phenolischen Säuren glycosidisch gebunden vor.

Durch die Fermentation werden diese Komponenten freigesetzt, sodass diese ebenfalls eine Veränderung der Beschaffenheit des Weines bewirken. Die freien und veresterten phenolischen Säuren verleihen dem Wein Bitterkeit, einen adstringierenden Geschmack und Aroma [117]. Der Gehalt der Säuren im Wein kann sehr stark in der Zusammensetzung und in der Konzentration schwanken [114]. Neben den phenolischen Verbindungen besitzt Wein eine Fülle an weiteren Komponenten, die bereits im Most enthalten waren oder während des Herstellungsprozesses entstanden sind [118, 119]. Aus diesem Grund wird für die Untersuchung von Wein eine Analyseverfahren benötigt, die eine hohe Trennleistung bietet [117, 120].

3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Es soll eine on-line-LC x LC zur Analyse von Tee entwickelt werden. Im ersten Schritt sollen die einzelnen Parameter des Systems auf ihre Eignung geprüft und wenn nötig optimiert werden. Anschließend soll eine Bewertung der Einsatzmöglichkeit der comprehensiven zweidimensionalen Flüssigchromatographie zur qualitativen und quantitativen Analyse vorgenommen werden. Des Weiteren soll mit der optimierten Methode eine semiquantitative Beurteilung von Catechinen aus zwei unterschiedlichen Tees erfolgen.

Die wichtigsten Merkmale einer LC x LC-Methode sind die erzielte Orthogonalität und Peakkapazität. In dieser Arbeit soll eine Methode entwickelt werden, die auch bei komplexeren Peakverteilungen, eine geeignete Beurteilung dieser Merkmale ermöglicht.

Bei der Ausarbeitung eines LC x LC-Verfahrens zur Analyse von *Radix Angelicae sinensis* soll diese Methode eingesetzt werden, um das bestmögliche Verfahren zu identifizieren. Es soll auch ein Bezug zwischen erreichter Orthogonalität der Messung und der Trenneigenschaften der Säulen hergestellt werden. Für diese Untersuchungen dient *Radix Angelicae sinensis* beispielhaft für eine komplexe Matrix verwendet. Somit steht nicht die Identifizierung der Stoffe im Vordergrund, sondern die Analysenmethode und in diesem Zusammenhang deren Beurteilung und Optimierung.

In der Gegenüberstellung der on-line- und off-line-LC x LC sollen die Vor- und Nachteile der beiden Methoden gezeigt werden. Dabei werden die Peakkapazität, Orthogonalität, Verbrauch der Lösungsmittel, die Analysenzeit und die Qualität der MS-Spektren verglichen.

Zur Analyse von Weißwein soll eine comprehensive zweidimensionale Methode entwickelt werden, die sowohl Anionen (wie z.B. die Salze der phenolischen Säuren) als auch ungeladene polare Analyten (z.B. glycosidisch gebundene Phenole und Polyphenole) erfasst.

Schließlich soll eine weitere Technik der Recyclingchromatographie entwickelt und vorgestellt werden. Hierbei sollen die Elemente des LC x LC-Systems zur Enantiomertrennung verwendet werden. Die Merkmale dieser Methode sollen mit schon bestehenden Techniken verglichen werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Aufbau eines on-line komprehensiven zweidimensionalen HPLC-Systems

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Aspekte einer LC x LC-Methodenentwicklung am Beispiel der Analyse von grünem Tee gezeigt.

4.1.1 Anforderungen an das Trennsystem

Ein LC x LC-System besteht aus zwei HPLC-Systemen, die miteinander über einen Modulator verbunden sind (siehe Kapitel 2.1.3). Bedingt durch den hohen Fluss in der zweiten Dimension muss das System bereits ab dem Modulator den Anforderungen eines UHPLC-Systems genügen. Das verwendete UHPLC-System (Shimadzu Prominence 20 xr) in der zweiten Dimension verfügte über drei Pumpen, die bis zu einem Gegendruck von 660 bar betrieben werden konnten. Auch das verwendete Zehn-Wege-Ventil konnte bei einem Druck von bis zu 660 bar eingesetzt werden.

In beiden Dimensionen wurde Gradient verwendet. Es bestehen in der HPLC zwei Möglichkeiten den Gradienten herzustellen: Mit einem Niederdruck- oder einem Hochdruck-Gradientensystem. Bei Niederdruckgradientensystem wird der Gradient vor der Pumpe gemischt, weshalb nur eine Pumpe benötigt wird. Der große Vorteil des Niederdruck-Gradientensystems ist die gute Durchmischung des Eluenten, auch bei geringem Fluss. Dagegen ist die Ansprechzeit von der Mischeinheit bis zum Eingang der Säule sehr hoch [121]. Bei dem Hochdruck-Gradientensystem ist es umgekehrt. Erst bei einem relativ hohen Fluss ist die Durchmischung ausreichend, während die Ansprechzeit kurz ist [78]. Deshalb wurden in dieser Arbeit die gute Durchmischung des Gradienten in der ersten Dimension bei geringem Fluss durch die Verwendung eines Niederdruck-Gradientensystems (Alliance 2690 Separations Module) sichergestellt. Die schnelle Ansprechzeit in der zweiten Dimension wurde durch die Verwendung eines Hochdruck-Gradientensystems (Shimadzu Prominence 20 xr) erreicht.

Wie die Hardware muss auch die Software den besonderen Ansprüchen der LC x LC gerecht werden. Die Besonderheit spiegelt sich sowohl in der Steuer- als auch in der Auswertesoftware wider. Die Steuerung des Gradienten der ersten Dimension wurde unabhängig von der zweiten Dimension und zeitgleich gestartet. Die Steuerung des

Modulators und des Gradienten in der zweiten Dimension sollte exakt zeitlich aufeinander angepasst werden. Die zusätzliche Herausforderung liegt dabei in der Wiederholung des gleichen Prozesses in regelmäßigen Abständen. In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Version der LC-Solution-Software verwendet. Diese erlaubt die Steuerung des Zehn-Wege-Ventils und die Mischung des Gradienten.

4.1.1.1 Säulendimensionen und Säulenmaterial

In der on-line LC x LC erfolgt die Trennung der Analyten auf zwei unterschiedlichen Säulen. Die Säulen sollten möglichst verschiedene Selektivitäten aufweisen. Unterschiedliche Trennmechanismen führen zu einem gewissen Grad der Orthogonalität der LC x LC-Messung. Es muss auch berücksichtigt werden, dass die Analyse in der zweiten Dimension nur so lang wie der Sammelzyklus der Fraktion sein darf. Die Peaks der ersten Dimension sollten im besten Fall in drei bis vier Fraktionen aliquotiert werden. Außerdem ist das Volumen der Fraktion möglichst klein zu halten [122, 123]. Aus diesen Gründen ergeben sich verschiedene Anforderungen an die Trennungen in den beiden Dimensionen. Die Entwicklung einer LC x LC-Applikation beginnt mit der Optimierung der zweiten Dimension [45]. Erst wenn die Analysenzeit in der zweiten Dimension feststeht, kann mit der Optimierung der ersten Dimension begonnen werden. Angestrebt ist dabei eine möglichst kurze Analysenzeit in der zweiten Dimension mit hoher Trennleistung.

a) Die zweite Dimension

Der Einsatz von Umkehrphasen in beiden Dimensionen der LC x LC ist ein gängiges Verfahren zur Erstellung von zweidimensionalen Analysen. Der Hauptvorteil dieser Methode, im Gegensatz zu Kopplung von NP mit RP, ist die Kompatibilität der Eluenten in beiden Dimensionen. Bis auf wenige Ausnahmen wird in der Regel in der zweiten Dimension eine RP18-Säule verwendet [43]. Der Grund dafür ist die weite Verbreitung und hohe Effizienz dieser Säulen. Neben der Phasenwahl spielen auch andere Aspekte wie die Länge und Breite einer Säule in der zweiten Dimension eine Rolle:

1. Die Bodenzahl einer Säule steigt mit der Wurzel der Säulenlänge an. Aus diesem Grund ist die Verwendung längerer Säulen sinnvoll [36].

2. Die Analysenzeit in der zweiten Dimension muss möglichst kurz sein. Das verhindert den Einsatz von langen Säulen. Bei der Verwendung von Gradienten in der zweiten Dimension muss zusätzlich die Reequilibrierungszeit berücksichtigt werden, die die Analysenzeit zusätzlich verlängert.
3. Das Fraktionsvolumen hat einen direkten Einfluss auf die Trennleistung der Säule [123]. Bei hohem Fraktions-/Injektionsvolumen dringt die Probe tiefer in die Säule ein, ohne eine Trennung zu erfahren [124]. Breitere Säulen können diesen Effekt minimieren, da die Probe auf eine größere Fläche verteilt und die Aufnahmekapazität so gesteigert wird [125].
4. Die Reduzierung des Säulendurchmessers von 4,6 mm auf 3,0 mm verringert den Eluentverbrauch um Faktor 2,4 oder erlaubt die Durchführung der Analyse bei gleichem Fluss in nur 42 % der ursprünglichen Zeit. Beide Effekte sind erwünscht. Der Lösungsmittelverbrauch ist ein Kostenfaktor und auch aus ökologischer Sicht bedeutend. Zudem kommt es durch die Verwendung eines geringeren Flusses zu einer geringeren Verdünnung der Probe im Eluenten, was zu einer Empfindlichkeitssteigerung führt. Die meisten Ionenquellen von Massenspektrometern arbeiten am besten bei relativ geringem Fluss (0,2-0,5 mL/min), sodass bei hohen Flüssen in der zweiten Dimension ein Split erforderlich ist. Je geringer der Fluss, desto geringer ist der nötige Split und desto mehr Substanz erreicht den Detektor.

Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit Säulen mit unterschiedlichen Durchmessern und Längen eingesetzt und verglichen. Neben der Variation der Säulendimensionen sollte auch die Beschaffenheit des Phasenmaterials betrachtet werden. Kleine Partikel ($< 2\mu\text{m}$) sind für schnelle Analysen gut geeignet, bauen aber einen großen Gegendruck auf und verstopfen leicht. Wie schon im Abschnitt 2.1.1 beschrieben, stellen Partikel mit einem nichtporösen Kern eine Alternative dar. In dieser Arbeit wurden Säulen mit solchem Material von zwei unterschiedlichen Herstellern verwendet: Halo-Phasen von Advanced Materials Technology und die Kinetex[®]-Phasen von Phenomenex[®]. Zusätzlich wurde eine monolithische Säule, Monolith[®] von Merck eingesetzt.

Die Analysenparameter waren für alle untersuchten Säulen gleich. Jede Säule wurde bei zwei unterschiedlichen Flüssen (2,25 und 3,00 mL/min) und zwei unterschiedlichen Gradientenzeiten (1 und 2 min) getestet. Als Testmischung wurden 25 μL einer wässrigen Lösung von je 10 mg/L Uracil (als Totzeitmarker) und Koffein (als Analyt) eingesetzt. Die

Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Die vollständige Tabelle befindet sich im Anhang Tabelle 17.

Tabelle 1: Vergleich der Säulen für die zweite Dimension anhand von Koffein

RP 18 Säule	Dimensionen [mm]	Gradientendauer [min]	Fluss [mL/min]	Retention			Breite w_h Koffein [min]	Bodenzahl N	Peakkapazität n	Druckabfall [bar]
				Uracil (t_d) [min]	Koffein (t_{dr}) [min]	Koffein (t_r) [min]				
Kinetex [®]	3x30	1	2,25	1,107	1,625	0,518	0,021	3377	28	300
Kinetex [®]	3x30	1	3,00	1,086	1,545	0,459	0,021	2651	28	425
Kinetex [®]	3x30	2	2,25	1,106	1,780	0,674	0,025	4034	47	300
Kinetex [®]	3x30	2	3,00	1,081	1,665	0,584	0,030	2103	39	425
Kinetex [®]	3x50	1	2,25	1,151	1,825	0,674	0,027	3458	22	530
Kinetex [®]	4,6x30	1	2,25	1,192	1,905	0,713	0,030	3135	20	160
Kinetex [®]	4,6x30	2	2,25	1,196	2,237	1,041	0,040	3759	29	160
Halo [®]	4,6x50	1	2,25	1,253	2,053	0,800	0,028	4531	21	260
Halo [®]	4,6x50	1	3	1,196	1,981	0,785	0,030	3800	20	350
Monolith [®]	4,6x50	1	2,25	1,409	2,276	0,867	0,034	3609	17	75
Monolith [®]	4,6x50	1	3,00	1,312	2,101	0,789	0,035	2820	17	100
Monolith [®]	4,6x50	2	2,25	1,409	2,682	1,273	0,046	4250	26	75
Monolith [®]	4,6x50	2	3,00	1,307	2,467	1,160	0,047	3381	25	100

Bei allen Säulen ist zu beobachten, dass die Erhöhung des Flusses von 2,25 mL/min auf 3 mL/min die Bodenzahl verringert. Die Variation des Flusses hat jedoch kaum bis keine Auswirkung auf die Peakkapazität. Die Verdoppelung der Analysenzeit von 1 auf 2 Minuten führt erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der Bodenzahlen und Peakkapazitäten.

Der Vergleich zweier Säulen mit gleichem Durchmesser aber unterschiedlicher Länge (Kinetex[®] 3 mm x 30 mm mit Kinetex[®] 3 mm x 50 mm) zeigt eine höhere Bodenzahl bei der längeren Säule. Jedoch führt die Analyse auf der kleineren Säule zu höheren Peakkapazitäten. Der Grund dafür ist die stärkere Peakverbreiterung in der längeren Säule. Der gleiche Effekt kann auch beim Vergleich der Kinetex[®] 4,6 mm x 30 mm mit der Halo 4,6 mm x 50 mm beobachtet werden. Zwar ist die Bodenzahl für die Halo-Säule deutlich höher, das hat aber kaum einen Einfluss auf die Peakkapazität.

Der Vergleich mit gleichen Säulenlängen jedoch unterschiedlichen Durchmessern zeigt, dass bei einer Injektion von 25 µL die Säulen mit schmalerem Durchmesser höhere Peakkapazitäten liefern.

Zusätzlich zu den fused-core Säulen wurde auch eine monolithische Säule getestet. Diese Säule zeigt im Vergleich zu gleichdimensionierten Halo-Säule geringere Bodenzahlen und Peakkapazitäten. Der große Vorteil monolithischen Säulen ist der geringere Druckabfall.

Werden die Säulen untereinander verglichen, liefert die kleinste Säule die beste Peakkapazität. Ein weiterer Vorteil der schmalen und kürzeren Säulen ist das geringere Säulenvolumen, sodass bei Einsatz eines Gradienten die Regenerationszeit kürzer ist.

Die in diesem Versuchsaufbau erzielten Peakkapazitäten können nicht direkt auf eine zweidimensionale Messung übertragen werden. Erstens wurden in den Analysenzeiten die Regenerationszeit und die Reequilibration nicht berücksichtigt. Zweitens wurde in diesem Vorversuch eine wässrige Probe injiziert. Bei einer LC x LC-Analyse enthält das Eluat der ersten Dimension in der Regel höhere organische Anteile. Aus diesem Grund verringert sich die erzielbare Peakkapazität [124]. So kann die Optimierung der zweiten Dimension nicht vollkommen unabhängig von der ersten Dimension betrieben werden. Erst mit dem Wissen der Zusammensetzung des Eluats der ersten Dimension kann das höchst zulässige Volumen der Fraktionen abgeschätzt werden. Je höher der organische Anteil im Eluent der ersten Dimension und das Fraktionsvolumen ist, desto größer muss der Durchmesser der zweiten Dimension gewählt werden.

b) Die erste Dimension

Bei der ersten Dimension ist es ebenfalls wichtig, die Länge und die Breite der Säule zu betrachten. Die Peaks der ersten Dimension sollten in drei bis vier Fraktionen unterteilt und in die zweite Dimension injiziert werden. Das kann nur erreicht werden, wenn die Analysenzeiten in der zweiten Dimension sehr kurz und die Peakbreiten in der ersten Dimension ausreichend groß sind. Breite Peaks und gleichzeitig kleine Fraktionsvolumina können nur realisiert werden, wenn der Fluss verlangsamt wird. Dadurch wird das Optimum der Van-Deemter-Kurve verlassen, was in einer deutlichen Steigerung der Bodenhöhe resultiert. Um trotzdem eine ausreichende Trennleistung in der ersten Dimension zu erhalten, wird oft mit langen Säulen gearbeitet. Der Durchmesser der Säulen in der ersten Dimension sollte so klein wie möglich gewählt werden, um das Fraktionsvolumen zu reduzieren. Hier setzt das Totvolumen des LC x LC-System eine Grenze.

Die bestmöglichen Resultate in der LC x LC werden nur erzielt, wenn die beiden Trennmechanismen möglichst unterschiedlich sind. Neben einer Vielzahl möglicher Kopplungsmöglichkeiten nimmt die Kopplung von zwei Umkehrphasen eine wichtige Rolle

ein [43]. Die geforderten Unterschiede in den Selektivitäten können erreicht werden, wenn die Phase modifiziert wird und/oder die Zusammensetzung des Eluenten verändert wird [126]. Um die Peakverbreiterung bei Injektion in die zweite Dimension zu reduzieren, ist es von Vorteil, den Eluent der ersten Dimension so zu wählen, dass seine Elutionskraft auf der zweiten Dimension möglichst gering ist [124].

Das Retentionsverhalten der ungeladenen, unpolaren oder mittelpolaren Analyten auf modifizierten Umkehrphasen wie Cyano-, Amino- oder Diolphasen ist in der Regel schwächer als auf einer RP18-Phase. Diese Tatsache begünstigt den Einsatz solcher Phasen in der ersten und einer RP18-Phase in der zweiten Dimension.

Die Charakterisierung der Selektivität der Umkehrphasen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen [127 - 130]. In dieser Arbeit wird der Neue-Test angewendet [68]. Dieser Test basiert auf der Analyse von sieben Analyten. Dabei wird Uracil als Totzeitmarker verwendet. Naphthalin und Acenaphthen werden als Marker für die hydrophoben Wechselwirkungen, Propranolol und Amitriptylin als basische Komponenten und Butylparaben und Dipropylphthalat als Marker für die polare Selektivität eingesetzt [68]. Durch die Bestimmung der Retentionsfaktoren für jeden einzelnen Analyten mit einer genau definierten Methode können die unterschiedlichen Wechselwirkungen der Analyten mit der Säule beschrieben werden. Da Säulen mit unterschiedlichen Durchmessern getestet wurden, wurde der Fluss der mobilen Phase zu der jeweiligen Säule so angepasst, dass der relative Fluss (cm/min) konstant gehalten wurde. Die verwendeten Methoden sind im Anhang beschrieben.

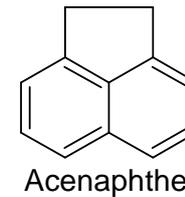
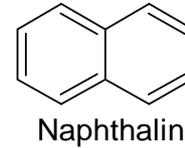
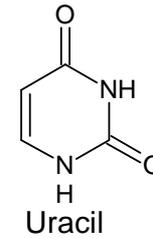
Untersucht wurde eine Pentafluorphenolphase (Kinetex[®] PFP von Phenomenex[®]), zwei Cyanophasen (CN Phase von Machery Nagel und Luna[®] von Phenomenex[®]) und eine RP18 Phase (Kinetex[®] RP18 von Phenomenex[®]). Die Kinetex[®] RP18 Säule ist für die zweite Dimension vorgesehen. Die drei anderen Säulen kommen als erste Dimension in Frage. Auf diesem Weg sollen mögliche Unterschiede in den Retentionsmechanismen identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Anhand der berechneten Werte können die Eigenschaften der Säulen nun beurteilt werden.

Dieser Test unterscheidet vier Wechselwirkungen:

1. Hydrophobe Wechselwirkungen ν

ν beschreibt die reinen unpolaren Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase [68].

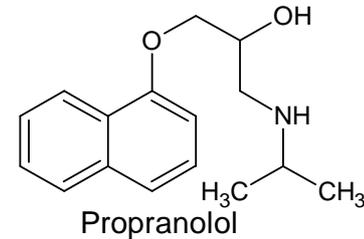
$$\nu = \frac{\ln(k_{\text{Naphthalin}}) + 3,068}{124} = \frac{\ln(k_{\text{Acenaphthen}}) + 3,068}{135}$$



2. Silanolische Wechselwirkungen S

S beschreibt die Wechselwirkungen von Analyten mit den Silanolgruppen des Trägermaterials der Säule [68].

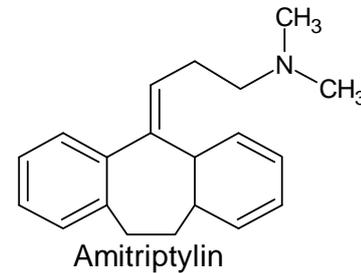
$$S = \ln(k_{\text{Amitriptylin}}) - 0,7124 * \ln(k_{\text{Acenaphthen}}) + 1,9748$$



3. Phenolische Wechselwirkungen P

P beschreibt die Wechselwirkungen der Phenolgruppen der Analyten mit der stationären Phase [68].

$$P = \ln(k_{\text{Butylparaben}}) - 0,8962 * \ln(k_{\text{Dipropylphthalat}})$$



4. Erweiterte polare Selektivität E

E beschreibt die polaren Wechselwirkungen, die mit P oder S nicht beschrieben werden können [68].

$$E = \ln(k_{\text{Propranolol}}) - 0,6815 * \ln(k_{\text{Amitriptylin}})$$

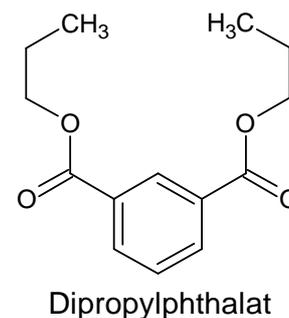
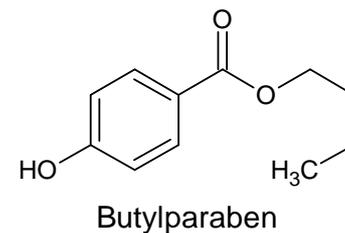


Abbildung 13: Standards des Neue-Tests

Tabelle 2: Bestimmung der Säuleneigenschaften nach Neue [68].

Säule	Kinetex [®] PFP	1. Dimension		2. Dimension	
		Luna [®] CN	Machery Nagel CN	Kinetex [®] RP18	
Uracyl					
Naphthalen	2,17	0,31	0,46	3,05	
Acenaphthen	4,73	0,41	0,61	6,89	
Propranolol	6,74	3,85	1,03	1,09	
Amitriptylin	14,13	3,77	1,63	10,96	
Butylparaben	1,24	0,05	0,21	1,61	
Dipropylphthalat	2,64	0,14	0,37	3,12	
Charakterisierung des Säulenmaterials nach Neue [68]					
Hydrophobe Wechselw.	ν	0,031	0,015	0,019	0,034
Silanolische Wechselw.	S	3,52	3,94	2,81	2,99
Phenolische Wechselw.	P	-0,65	-1,27	-0,64	-0,54
Erweiterte polare Selektivität	E	0,10	0,44	-0,31	-1,55

Der größte Unterschied zwischen den Retentionsmechanismen der RP18-Säule und der Cyanophasen liegt in den hydrophoben Wechselwirkungen. Die erweiterte polare Selektivität der RP18 unterscheidet sich deutlich von allen anderen getesteten Phasen. Eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 14 gezeigt.

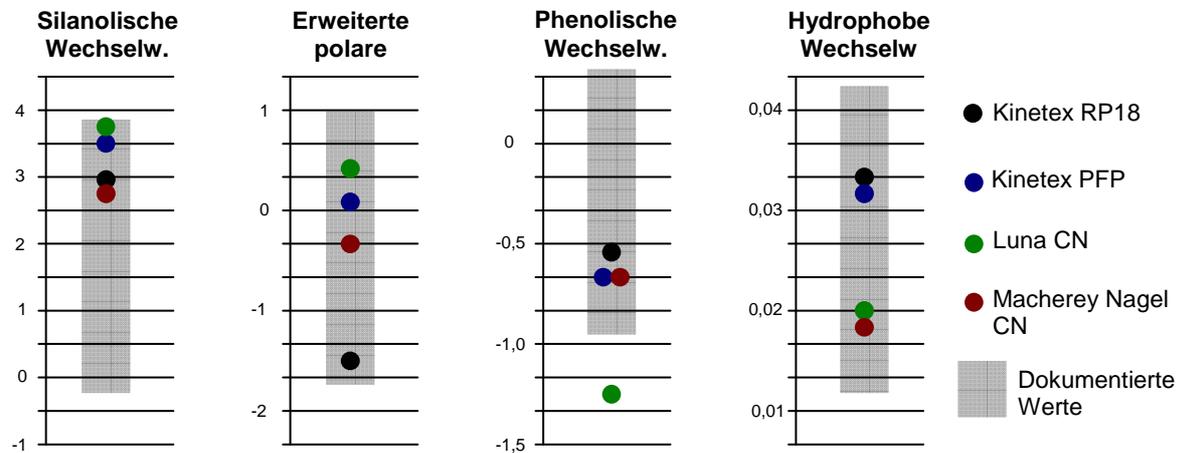


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Parameter des Neue-Testes für folgende Säulen: Kinetex[®]-RP18, Kinetex[®]-PFP, Luna[®] CN-Phase (alle von Phenomenex[®]), CN-Phase (Machery-Nagel). Gezeigt sind ebenfalls die dokumentierten Werte für die jeweilige Wechselwirkungen [68].

Erwartungsgemäß zeigt die Phase mit RP18 Belegung starke hydrophobe Wechselwirkungen. Die PFP-Phase verfügt im Gegensatz zu den beiden CN-Phasen ebenfalls über ausgeprägte hydrophobe Wechselwirkungen. Bei den silanolischen Wechselwirkungen kann kein Trend ausgemacht werden. Je nach Grad der Abschirmung der Silanolgruppen des Grundgerüsts kann dieser Wert von Hersteller zu Hersteller schwanken. Dies ist unabhängig von der

Modifikation an der Oberfläche. Die Unterschiede bei den erweiterten polaren Selektivitäten sind deutlich zu erkennen. Bei der RP18 sind diese nur sehr schwach ausgeprägt, während die CN- und PFP-Phasen deutlich stärkere Wechselwirkungen zeigen. Die phenolischen Wechselwirkungen sind bei allen Säulen nur schwach ausgeprägt. Überraschend ist der sehr kleine Wert für die Luna CN-Phase. Dieser Wert liegt deutlich tiefer als die von Neue dokumentierten Werten. Hierfür konnte keine Erklärung gefunden werden.

Die gezeigten Wechselwirkungen der Analyten mit dem Phasenmaterial beschreiben die Retentionsmechanismen der jeweiligen Phase. Auf jeden Analyten wirken die einzelnen Trennmechanismen unterschiedlich stark. Aus diesem Grund kann die Gesamtselektivität der einzelnen Phasen abgeschätzt werden. Die beste Phase für die erste Dimension wäre demnach die Phase, mit dem größten Unterschied in der Selektivität zu der zweiten Dimension. Die Retentionsmechanismen, die in der zweiten Dimension (RP18) besonders schwach ausgeprägt sind, sind in der ersten Dimension von besonderem Interesse und umgekehrt. Da es aber vier verschiedenen Parameter zur beachten gibt, kann eine allgemeingültige Aussage, welche Säulenkombination die Bestmögliche ist, nicht gemacht werden. Enthält die zu untersuchende Probe Analyten die sowohl auf phenolische als auch auf hydrophobe Wechselwirkungen ansprechen, wäre die Säulenkombination aus Luna CN und RP-18 sinnvoll. Alle drei Kopplungsmöglichkeiten versprechen eine gute Trennung von Analyten, die sowohl hydrophobe und polare Wechselwirkungen mit den Säulen ausbilden. Je nach Fragestellung kann die eine oder die andere Säulenkombination bessere Resultate liefern. So muss die Probe als maßgeblicher Einflussfaktor bei der Auswahl der Säulenkombination berücksichtigt werden.

4.1.2 Anforderungen an den Detektor

Die Detektion in der LC x LC erfolgt nach der Trennung in der zweiten Dimension. Bedingt durch den hohen Fluss in der zweiten Dimension und den schmalen Peaks ergeben sich besondere Anforderungen an den Detektor.

4.1.2.1 UV/Vis – Detektor

Die schmalen Peaks können nur ausreichend gut aufgelöst und dargestellt werden, wenn die Aufnahmerate des Detektors ausreichend hoch ist. Die Angaben zur Anzahl benötigte Datenpunkte pro Peak, um diesen vollständig darzustellen, reichen von 7 bis 20 Punkte [131 -

133]. Allgemein wird angenommen, dass 10 Punkte pro Peak ausreichen. Ist die Anzahl der Datenpunkte geringer, kommt es zu einer ungenauen Darstellung der Peaks und zur Peakverbreiterung. Mit dem verwendeten Detektor ist es möglich die Messung bei 40 Hz durchzuführen. Somit können Peaks mit Peakbreiten von 0,25 Sekunden ausreichen gut aufgelöst werden. Die Analysen haben gezeigt, dass die minimalen Peakbreiten ungefähr 1,0 Sekunde betragen.

Das Volumen der Detektorzelle im eingesetzten System beträgt 10 μ L. Dieses Zellvolumen wird bei einem Fluss von 2,25 mL/min in 0,27 Sekunden durchlaufen. Somit beträgt der Wert maximal ein Viertel der Peakbreite und trägt somit nur geringfügig zur Peakverbreiterung bei. Aus diesen Gründen ist die Verwendung dieses Detektors zulässig.

Neben dem geringen Beitrag zur Peakverbreiterung ist die Druckstabilität des Detektors von Interesse. Bei den vorgestellten Methoden wird nachdem DAD ein MS-Detektor angeschlossen. Die dafür benötigte Splittung des Flusses erzeugt einen Gegendruck. Die Druckstabilität des verwendeten Detektors wurde mit 100 bar angegeben und ist damit ausreichend. Somit erfüllt der verwendete Detektor, Shimadzu SPD 20M, alle Voraussetzungen und kann in der LC x LC eingesetzt werden.

4.1.2.2 Massenspektrometer

Die im Abschnitt 4.1.1.1 gezeigte Peakkapazität ist nur mit hohen Flüssen von 3,00 bzw. 2,25 mL pro Minute in der zweiten Dimension möglich. Für einen UV-Detektor stellen solch hohe Flüsse kein großes Problem dar. In Abbildung 15 ist eine eindimensionale Analyse von *Radix Angelica sinensis* auf der Säule der zweiten Dimension mit optimierten Bedingungen dargestellt. Als Detektor wurde hier ein DAD eingesetzt. Die einzelnen Peakbreiten betragen ca. 0,04 Minuten, was etwa 2,4 Sekunden entspricht. Somit ist für diese eindimensionale Methode eine Peakkapazität von ca. 25 erreicht.

Eine massenspektrometrische Detektion bei einem Fluss von 3,00 mL/min ist jedoch nicht ohne weiteres möglich. Bei Einsatz der Elektrospray-Ionisation (ESI) ist der Fluss auf maximal 0,2 mL/min zu begrenzen. Somit ist ein Split des Flusses unumgänglich. Hierfür wurde ein T-Stück mit zwei Kapillaren verwendet. Der eingestellte Split betrug 1 zu 20.

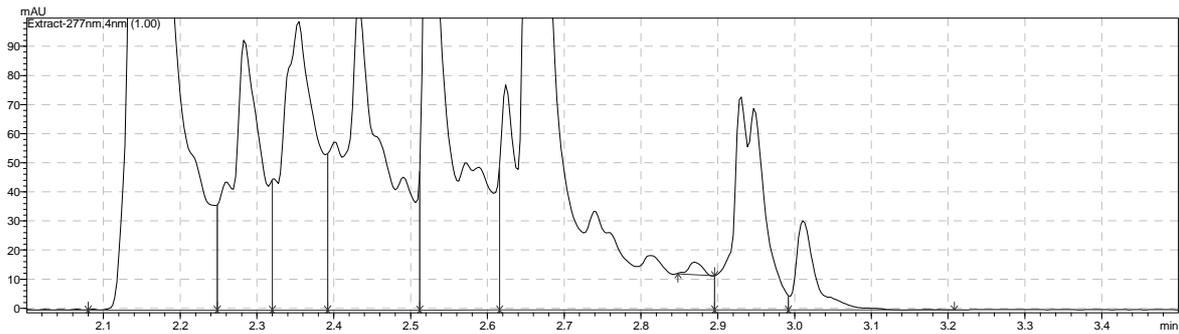


Abbildung 15: Eindimensionale Messung der zweiten Dimension. Probe: *Radix Angelicae sinensis*; HALO RP18-Phase 4,6 x 30. Gradient: eine Minute; Fluss: 3 mL/min; Detektor: UV bei 277 nm. Die Analyse beginnt nach der zweiten Minute.

Bei der Detektion mit dem MS trat ein unerwartetes Problem auf. Die Peakbreiten der einzelnen Peaks betragen etwa 6 Sekunden. Das bedeutet, dass sich die Peakbreite zwischen DAD und MS mehr als verdoppelt hatte und als Folge davon wurde die Peakkapazität halbiert. Die wahrscheinlichste Erklärung für die Peakverbreiterung nach der Säule ist das Vorhandensein eines Totvolumens. Eine geringfügige Verbreiterung der Peaks wurde durch das T-Stück oder der Verbindung zum MS erwartet. Ein solch gravierender Unterschied kann so jedoch nicht erklärt werden. Da der Split als Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte, blieb die MS-Quelle als einzig mögliche Ursachen. Bei genauerer Untersuchung der Verbindung zwischen der Stahlkapillare der ESI-Quelle und der HPLC-Kapillare konnte die Ursache für die Peakverbreiterung identifiziert werden und ist in Abbildung 16 dargestellt.

Um die Stahlkapillare mit dem System zu verbinden, wird diese mit einem Teflonschlauch ummantelt. Da der Teflonschlauch 0,7 mm zu kurz und zusätzlich nicht genau geschnitten war, entstand ein Totvolumen von ca. 1,7 μL . Bei herkömmlichen HPLC-Analysen mit Peakbreiten von mehr als 30 Sekunden hat dieses Volumen keinen merklichen Einfluss. Im dargestellten Fall sind die Peaks nur 0,04 Minuten breit. Das bedeutet, dass sich der Analyt nach dem Split in nur ca. 6 μL Eluent befindet. Das Verhältnis zwischen diesem Volumen und dem Totvolumen beträgt nur noch ca. 3,5. Dieses führt zu der beobachteten Peakverbreiterung.

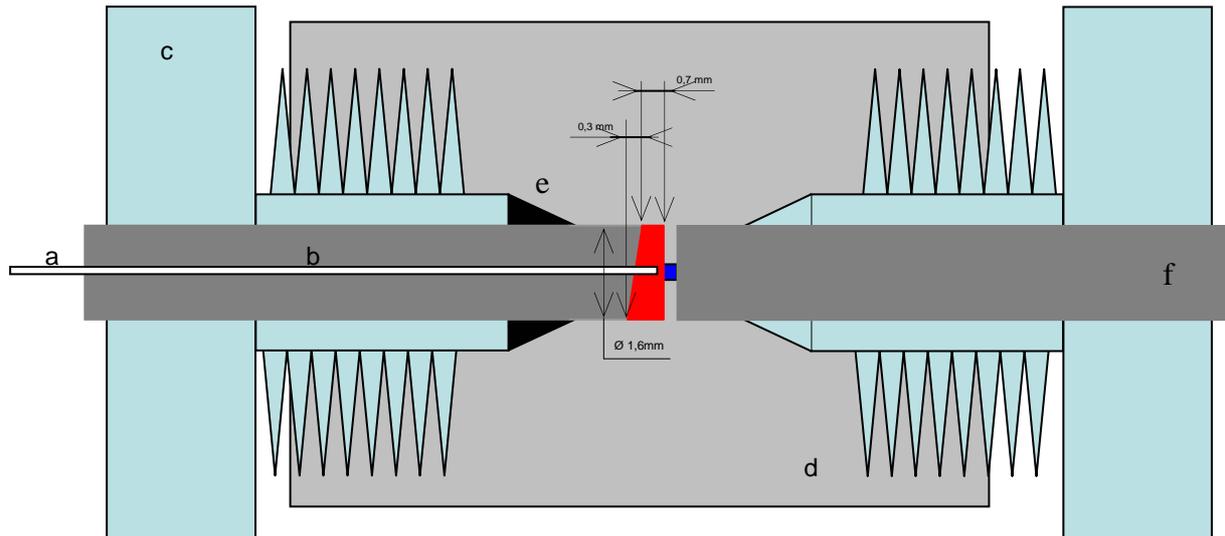


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Verbindung der Stahlkapillare der ESI-Quelle mit der HPLC-Kapillare. a: Stahlkapillare, b: Teflonummantelung, c: PEEK-Anschlüsse, d: Kupplung aus PEEK, e: Ferrul, f: PEEK-Kapillare von der HPLC. Die rot markierte Fläche stellt das Totvolumen dar.

Nach der Korrektur der Ummantelung der Stahlkapillare konnte dieses Problem beseitigt werden. In der Abbildung 17 sind die Chromatogramme vor und nach dieser Optimierung gezeigt. Als Beispiel wurde ein Peak mit $m/z = 169$ ausgewählt. Vor der Optimierung beträgt die Peakbreite 0,1 Minuten, nach der Optimierung 0,05 min. Als positiver Nebeneffekt konnte so auch die Intensität um mehr als 50 % gesteigert werden.

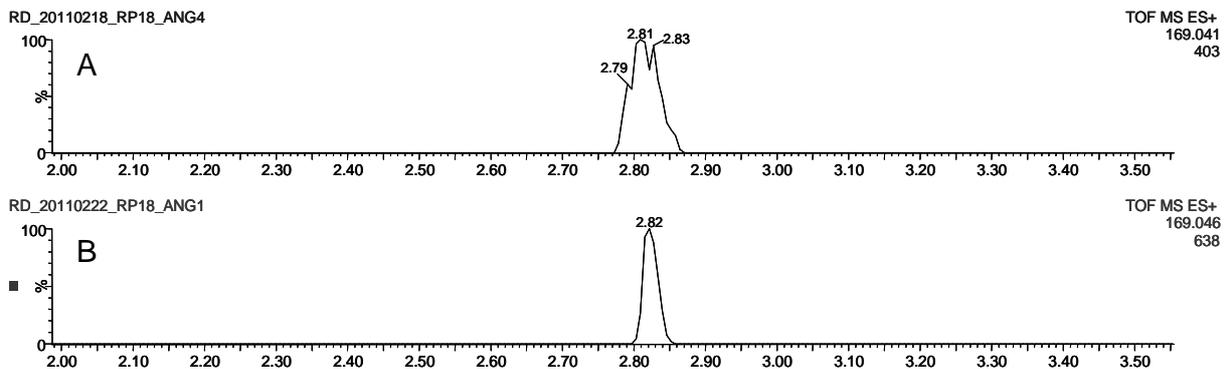


Abbildung 17: Eindimensionale Messung der zweiten Dimension. HALO RP18 4,6 mm x 30 mm. Gradientdauer: eine Minute; Injektion nach 2 min; Fluss: 3 mL/min; Detektor: ESI Positiv TOF-MS. A: EIC $m/z = 169$ vor der Optimierung, B EIC $m/z = 169$ nach der Optimierung.

4.1.3 Analyse von Matcha-Tee mittels comprehensiver zweidimensionaler HPLC

Dem Tee und somit auch dessen Inhaltsstoffen werden zahlreiche gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben [134]. Schon früh wurde erkannt, dass die Catechine

maßgeblich für diese Eigenschaften verantwortlich sind [89, 135]. Neben den Catechinen sind eine ganze Reihe von anderen Stoffgruppen im Tee enthalten [136 - 138]. So stand Tee schon mehrmals im Mittelpunkt diverser wissenschaftlicher Arbeiten [91, 139 - 141]. In den letzten Jahren wurde auch versucht mit zweidimensionalen Trenntechniken die Zusammensetzung von Tee besser zu beschreiben [142]. So haben Singh et al. 1999 eine DC x DC-Methode zur Analyse von Tee vorgestellt. Es konnten sechs Catechine und bis zu 12 weitere Inhaltsstoffe getrennt und nach Derivatisierung mit diazotiertem Sulfanilamid detektiert werden [143]. Elf Jahre später haben Kalili und Villiers eine off-line LC x LC-Analyse eines Acetonextraktes von Tee durchgeführt [33]. In der ersten Dimension wurde eine HILIC und in der zweiten Dimension eine RP18-Säule verwendet. Das Eluat wurde nach der ersten Dimension aufgefangen und 4 % von jeder Fraktion wurden ohne weitere Aufbereitung auf die zweite Dimension injiziert. Mit dieser Technik konnte eine deutlich größere Zahl an Komponenten getrennt werden. Dank der Kopplung mit ESI-MS wurden über 50 Inhaltsstoffe identifiziert. Während bei off-line LC x LC einzelne Fraktionen gesammelt und bis zur Analyse in der zweiten Dimension aufbewahrt werden müssen, werden bei der on-line LC x LC die Fraktionen zeitgleich analysiert. Bei der hier verwendeten Methode wird eine Cyanophase in der ersten und eine RP18-Phase in der zweiten Dimension verwendet [144].

Wie in Kapitel 4.1.1.1 beschrieben, beginnt die Planung eines comprehensiven Systems mit der Optimierung der zweiten Dimension. In diesem Fall wurde in der zweiten Dimension eine HALO C18-Säule (4.6 mm x 30 mm, 2.7 µm) eingesetzt. In den Vorversuchen (hier nicht gezeigt) wurde der Fluss auf 3,00 mL/min und eine Modulationszeit von 2,00 min festgelegt. Bei der Optimierung wurden die Gradientenzeit inklusive der Regenerationszeit, der Gegendruck, die Trennleistung und das Fraktionsvolumen berücksichtigt.

Bei diesem Fluss dauert die Regeneration und Equilibrierung der Säule 0,55 min, sodass die effektiv nutzbare Zeit bei einer Modulationszeit von zwei Minuten 1,45 min und bei einer Minute nur 0,45 min beträgt. Dies war das ausschlaggebende Argument für die Verwendung des längeren Gradienten.

Die Shimadzu Prominence Anlage wurde als HPLC-System für die zweite Dimension verwendet. Dieses System kann bei max. 660 bar Gegendruck betrieben werden, sodass die Säule auch mit höherem Fluss betrieben werden könnte. Der Fluss wurde jedoch wegen der folgenden massenspektrometrischen Detektion auf 3,00 mL/min begrenzt. Da bei den Teekomponenten eher polare Substanzen vermutet wurden, beträgt die maximale Methanolkonzentration des Gradientes 60 %.

Die Identifizierung der Analyten erfolgte anschließend mittels MS im ESI negativ Modus. Für die optimale Elektrospray-Ionisation wurde dem Gradienten über die gesamte Analysendauer (Tabelle 3) der zweiten Dimension 40 % einer 1 %igen Ameisensäure zugefügt [145].

Tabelle 3: Gradient in der zweiten Dimension für die Analyse von Matcha-Tee. Modulationsdauer: 2min, Fluss 3,00 mL/min

Zeit [min]	Pumpe A Wasser [%]	Pumpe B Methanol [%]	Pumpe C 1 % Ameisensäure [%]
0,03	55	5	40
1,25	10	50	40
1,35	0	60	40
1,45	0	60	40
1,50	20	40	40
1,80	55	5	40
2,01	55	5	40

Für die zweite Dimension wurde ein Injektionsvolumen von 100 µL gewählt. Damit die Schleife in zwei Minuten gefüllt werden kann, muss der Fluss in der ersten Dimension 50 µL/min betragen.

In der ersten Dimension wurde eine Cyanophasse (ProntoSIL 100-5-CN 2 3.0 mm x 190 mm, 5 µm, Bischoff, Leonberg (D)) verwendet. Bei einem Fluss in der ersten Dimension von nur 0,050 mL/min wurde nur ein minimaler Gegendruck erzeugt. Aus diesem Grund konnte eine konventionelle HPLC-Anlage eingesetzt werden. Als HPLC-System für die erste Dimension diente das Waters Separationsmodul 2690 mit einem Niederdruck-Gradientensystem.

Ein Chromatogramm der LC x LC-Analyse des Matcha-Tees zeigt Abbildung 18. In diesem Chromatogramm sind auf dem blauen Untergrund unterschiedlich gefärbte Spots zu erkennen. Die Spots stehen für eine oder mehrere detektierte Substanzen. Die Querstreifen im Chromatogramm stammen von Spots, die in allen Chromatogrammen der zweiten Dimension mit gleicher Retentionszeit auftauchen und somit systembedingt sind. Bei den durchnummerierten Spots handelt es sich um die detektierten Inhaltsstoffe des Tees.

Einige Inhaltstoffe (Tabelle 4) konnten anhand der Präzisionsmassen, MS-MS Experimenten und/oder Retentionsverhalten in Vergleich zur Literatur identifiziert werden [144]. Bei diesen Komponenten handelt es sich um Substanzen, die im Tee in höheren Konzentrationen vorkommen und somit bereits bekannt waren.

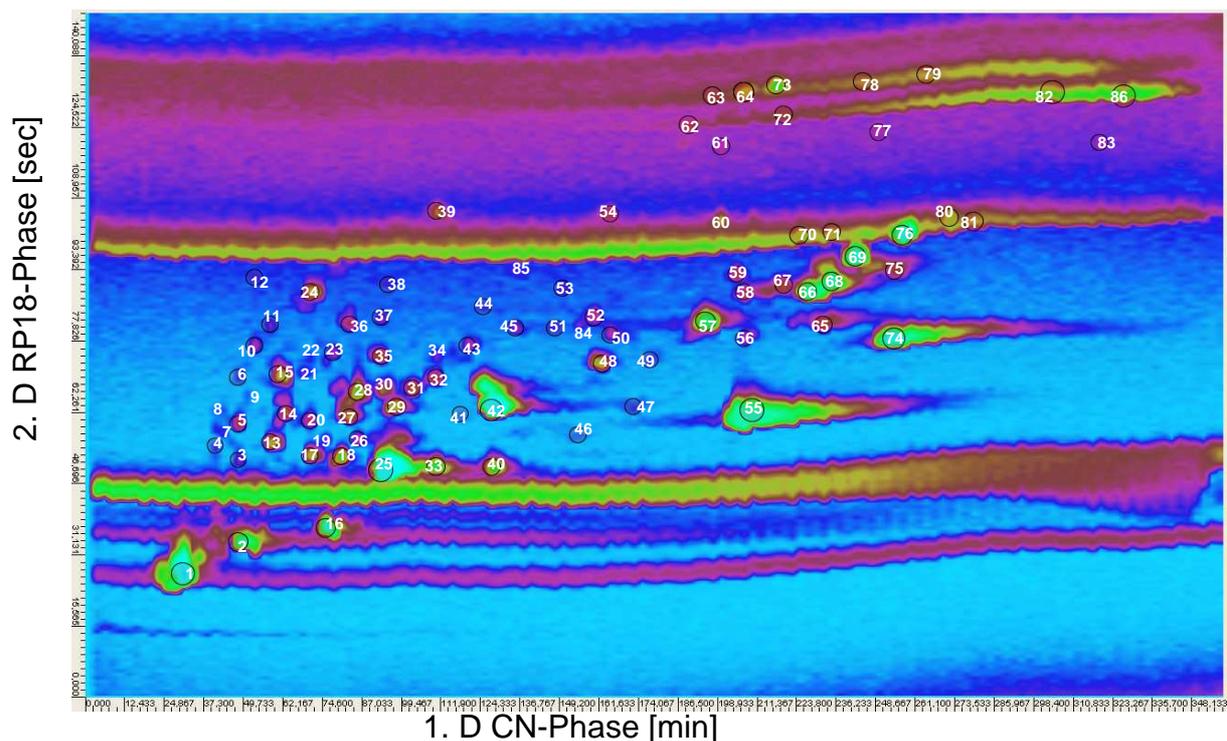


Abbildung 18: LCxLC Chromatogramm von Matcha-Tee. Es wurde eine Cyanophase in der ersten und eine RP-18-Phase in der zweiten Dimension verwendet. Detektion ESI(-)-TOFMS

Aus dem Chromatogramm in Abbildung 18 ist zu erkennen, dass Tee eine Vielzahl von Komponenten enthält. Erst eine leistungsstarke Trennmethode, wie die LC x LC, zeigt die Komplexität der Zusammensetzung des Tees wieder.

Tabelle 4: Übersicht der identifizierten Inhaltstoffe im Matcha-Tee [144].

Substanz	LC x LC-MS (ESI negativ)			Quellen
	Exakte Masse	ppm	MS-MS Fragmente	
Chinasäuregalloylester [2]	343,0696	-2,1	191; 169	[98]
(-) Gallocatechin [16]	305,0656	-1,7	261; 221; 219; 179	[97]
(-)-Epigallocatechin [25]	305,0664	0,9	261; 221; 219; 179	[97]
Chinasäurecumaroylester [29]	337,0850	-4,0	173	[98, 99]
(+)-Catechin [33]	289,0716	1,3	245; 205	[146]
(-)-Epicatechin [42]	289,0723	3,8	245; 205	[146]
(-)-Epigallocatechin-3-gallat [55]	457,0762	-1,9	331; 305; 169	[146, 147]
(-)-Epicatechin-3-gallat [74]	441,0830	1,9	169; 289; 331	[97, 146]

4.1.3.1 Vergleich von Matcha- und Sencha-Tee

Neben der rein qualitativen Analyse kann die comprehensive zweidimensionale Chromatographie auch zu quantitativen Zwecken eingesetzt werden. Hier soll ein semiquantitativer Vergleich zwischen Matcha- und Sencha-Tee gezeigt werden. In beiden Fällen handelt es sich um unfermentierte Tees (*Camellia sinensis*). Neben geringen Abweichungen in dem Anbau besteht der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Teesorten in der Art der Zubereitung und der Darbietung (vergleiche Abschnitt 2.1.1.) Sencha-Tee ist ein loser Blättertee, der nur wenige Minuten mit heißem Wasser extrahiert wird. Es wird nur der wässrige Extrakt (Tee) getrunken. Dagegen ist Matcha-Tee ein Pulver, das mit Wasser (oder einer anderen Flüssigkeit) suspendiert wird. Die gesamte Suspension wird getrunken. Aus diesem Grund wird erwartet, dass die Aufnahme von Inhaltsstoffen aus dem Matcha-Tee höher ist als bei Sencha-Tee.

Die bisherigen Vergleiche von Matcha- und Sencha-Tees in der Literatur zeigten ein widersprüchliches Bild. Bei gleichen Extraktionsbedingungen (Acetonitril/Wasser 1/1) [148] oder nur Wasser [88] werden im Sencha-Tee höhere Konzentrationen an Catechinen nachgewiesen. Extrahiert man dagegen mit 100 % Methanol steigt die Konzentration von (-)-Epigallocatechin-3-gallat und (-)-Epicatechin-3-gallat in Matcha-Tee deutlich, während die des (+)-Catechins sinkt [88]. Eine Übersicht der Befunde ist in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Bestimmung des Catechinsgehaltes in Sencha- und Matcha-Tee

Catechine	Gehalt im Verhältnis		
	MeOH Extr. Matcha / H ₂ O Extr. Sencha [88]	H ₂ O Extr. Matcha / H ₂ O Extr. Sencha [88]	ACN/H ₂ O 1/1 Matcha / ACN/H ₂ O 1/1 Sencha [148]
(-) Gallocatechin	---	---	---
(-)-Epigallocatechin	2,03	0,12	0,42
(+)-Catechin	0,13	Nicht bestimmbar	---
(-)-Epicatechin	9,09	0,55	0,41
(-)-Epigallocatechin-3-gallat	137	0,76	0,75
(-)-Epicatechin-3-gallat	128	2,5	0,88

In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Extraktionsverfahren angewendet und so die Unterschiede in der Zubereitung der Tees simuliert. Sencha-Tee wird gemäß einer

Teezubereitungsvorschrift zwei Minuten lang mit 70 °C heißem Wasser extrahiert. Matcha-Tee wurde dagegen 15 Stunden mit 10 %iger Methanollösung bei Raumtemperatur extrahiert. Es wurde bewusst auf die Extraktion der Probe mit einem höheren Methanolanteil verzichtet. Ein hoher Anteil an Methanol in der Injektionslösung verschlechtert die chromatographische Trennung aufgrund der starken Eluationskraft der Probelösung. Alternativ könnte Methanol durch Destillation entfernt werden. In dieser Arbeit wurde jedoch versucht, die temperatur- und lichtempfindlichen Catechine möglichst schonend zu extrahieren. Die genaue Probenvorbereitung wird im experimentellen Teil beschrieben. Die Proben wurden so hergestellt, dass die Menge an Tee pro Volumen gleich gehalten wurde.

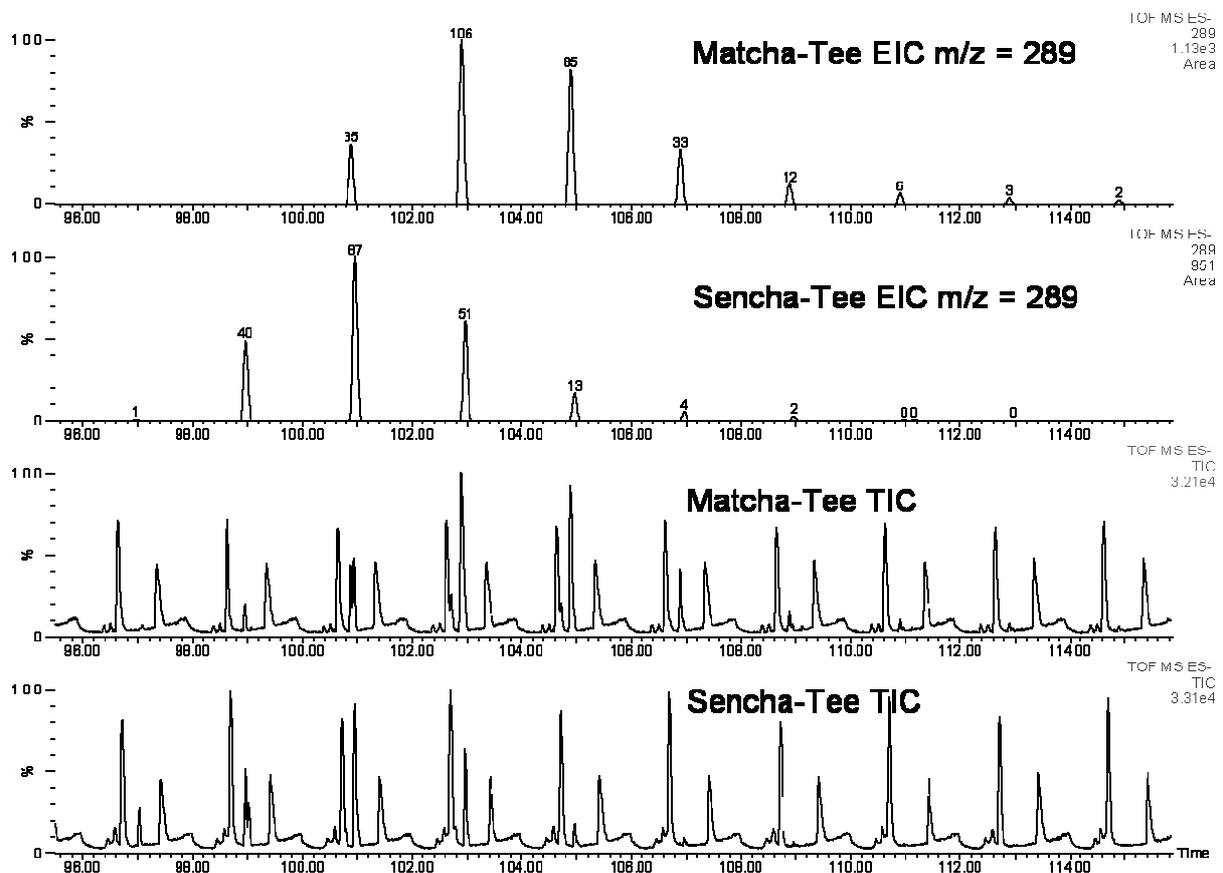


Abbildung 19: Ausschnitt der Chromatogramme zweier LC x LC-(ESI)-MS-Analysen vom Matcha- und Sencha-Tee. In den oberen Chromatogrammen ist der EIC $m/z = 289$ ($M - H$)⁻ von (-)-Epicatechin dargestellt.

Der Konzentrationsvergleich wurde am Beispiel von sechs Catechinen durchgeführt. Als Parameter wurden die Peakflächen der sechs Substanzen verglichen. Da der Peak aus der ersten Dimension mehrfach moduliert wird, ist dieser in einem eindimensionalen Chromatogramm mehrfach anzutreffen. In Abbildung 19 ist ein Ausschnitt der eindimensionalen Ansicht der beiden Chromatogramme dargestellt. Verglichen wurden die Peakflächen von (-)-Epicatechin ($m/z = 289$). Im EIC ist zu erkennen, dass die Peaks der

ersten Dimension ein Tailing aufweisen und in mehr als vier Fraktionen unterteilt sind. Auch weichen die Retentionszeiten in der ersten Dimension bei beiden Analysen leicht ab (ca. 2 %). Die Retentionszeiten in der zweiten Dimension sind dagegen identisch.

Wie erwartet wurden bei Matcha-Tee höhere Konzentrationen als beim Sencha-Tee beobachtet. Der Unterschied ist jedoch geringer als zuerst angenommen. Anders als bei Weiss und Anderton [88] ist das Verhältnis der Konzentrationen bei den sechs untersuchten Catechinen in beiden Proben eindeutig und einheitlich: Matcha-Tee setzt bis zu 2,27 mal mehr Catechine frei. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Schwankungen im Verhältnis der Catechine untereinander kann mehrere Gründe haben. Die unterschiedliche Anbauweise und die Verwendung der verschiedenen Teile des Tees können Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe haben. Die Vermahlung des Tees erhöht zudem dessen Oberfläche. Die Inhaltsstoffe des Matcha-Tee werden somit stärker der Oxidation durch Luftsauerstoff ausgesetzt. Je nach Catechin kann diese Abbaureaktion unterschiedlich stark ausfallen.

Tabelle 6: Vergleich der Catechine im Matcha- und Sencha-Tee

Catechine	Summierte Peakfläche		Verhältnis Matcha/Sencha
	Matcha-Tee	Sencha-Tee	
(-)-Gallocatechin [16]	295	130	2,27 / 1
(-)-Epigallocatechin [25]	925	679	1,36 / 1
(+)-Catechin [33]	48	22	2,2 / 1
(-)-Epicatechin [42]	283	198	1,43 / 1
(-)-Epigallocatechin-3-gallate [55]	1181	1076	1,10 / 1
(-)-Epicatechin-3-gallate [74]	541	441	1,23 / 1

Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Extraktion des Matcha-Tees mit der verwendeten Methode vollständig war. Um den wahren Unterschied zwischen dem Eintrag der Catechine durch das Trinken der unterschiedlichen Tees zu untersuchen, sollte die Konzentration der Catechine im Blut der Testpersonen nach dem Verzehr bestimmt werden. Die Tendenz zeigt jedoch deutlich, dass durch den Genuss von Matcha-Tee höhere Mengen an Catechinen aufgenommen werden. Diese Erkenntnis sollte auf weitere Inhaltsstoffe des Tees übertragbar sein.

4.2 Bestimmung der Peakverteilung bei zweidimensionalen Analysen

Die Peakkapazität ist ein Charakterisierungsmerkmal für die Trennleistung der gewählten Methode. Genauer beschreibt die Peakkapazität die Zahl der Komponenten, die mit einer chromatographischen Methode getrennt werden können. Die Qualität einer zweidimensionalen Messung hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einen sind die Peakkapazitäten der ersten und der zweiten Dimensionen ausschlaggebend. Zum anderen spielt auch die Unabhängigkeit der Trennmechanismen in beiden Dimensionen eine wichtige Rolle. Ein weiterer Faktor, der auch betrachtet werden muss, ist der Verlust der Trennleistung durch die Kopplung der ersten und der zweiten Dimension.

Um die Peakkapazität in LC x LC zu berechnen, müssen die Peakkapazitäten der beiden Dimensionen kombiniert werden. Um eine hohe Trennleistung für eine komplexe Probe zu erreichen, werden zwei möglichst unterschiedliche Systeme benötigt. Die Substanzen, die in der ersten Dimension koeluiieren, sollten in der zweiten Dimension getrennt werden können. Die Peakkapazitäten der beiden Dimensionen werden als 1n_1 und 1n_2 bezeichnet. Die maximal erreichbare Trennleistung wäre demnach das Produkt der beiden eindimensionalen Peakkapazitäten [149]:

$${}^2n = {}^1n_1 {}^1n_2$$

Gleichung 13

Die Gleichung ist nur gültig, solange die Trennungen in beiden Dimensionen absolut unabhängig voneinander und somit zufällig sind [69, 150]. Darüber hinaus darf kein Verlust der Trennung der ersten Dimension bei der Übertragung in die zweite Dimension auftreten [32]. Dies ist nur sehr selten der Fall [151].

4.2.1 Berechnung der Orthogonalität

Ein Maß für die Orthogonalität des Systems kann dem zweidimensionalen Chromatogramm entnommen werden. Dafür wird auf der x-Achse die erste Dimension und auf der y-Achse die zweiten Dimension dargestellt. Auf den Achsen werden die Peakkapazitäten aufgetragen. Je zufälliger die Analyten im zweidimensionalen Chromatogramm verteilt sind, desto höher ist die Orthogonalität. Vollständige Unabhängigkeit zweier chromatographischer Systeme ist fast ausgeschlossen, sodass sich die Spots in einem definierten Bereich des zweidimensionalen

Chromatogramms befinden. Dieser Bereich kann eindeutig von dem Raum ohne Spots getrennt werden und wird als die effektive Fläche A_{eff} bezeichnet. Dies führt zur Bildung diverser geometrischer Anordnungen der effektiven Fläche im Chromatogramm.

Bei Analysen mit direkter Korrelation kommt es oft zu einer geometrischen Anordnungen die als FAN (engl. *fan*) (Abbildung 20) bezeichnet wird [152]. Verteilungen dieser Art wurden bereits bei DC x DC Analysen beobachtet. In Abbildung 21 ist die gleiche Analyse aus dem Jahr 1963 wie in der Abbildung 6 [26] gezeigt. Das DC x DC zeigt die typische Verteilung der Spots einer direkten Korrelation und entspricht der Verteilung FAN.

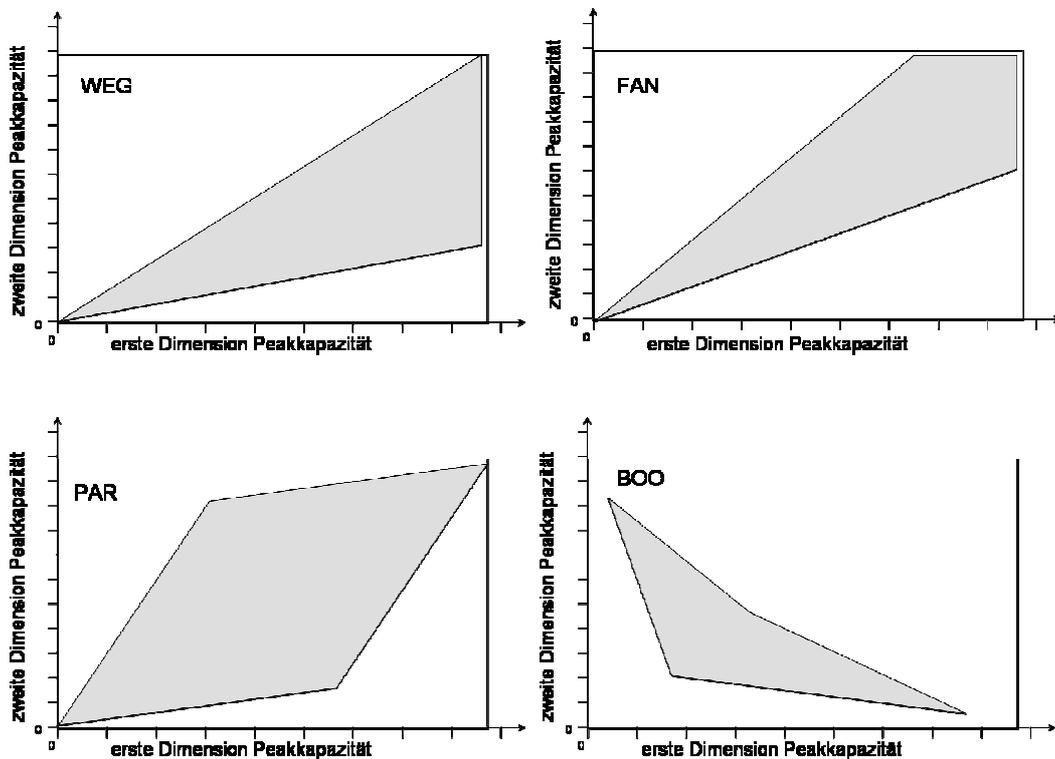


Abbildung 20: Auswahl der Verteilungen in der zweidimensionalen Chromatographie nach [152]; Erweitert um BOO

Eine ähnliche Verteilung ist auch bei der Kopplung der CN- und der RP18-Phase zur Untersuchung des Tees zu beobachten (Abbildung 18). Um bei solch einfachen Strukturen die Orthogonalität der Messungen abzuschätzen, werden zwei Methoden in der Literatur beschrieben. Zum einen ist es möglich als Maß der Orthogonalität den Winkel β zu verwenden (Abbildung 22 [153]). Die vollständigere und weiter verbreitete Methode ist die Berechnung nach Liu et. al. [66].

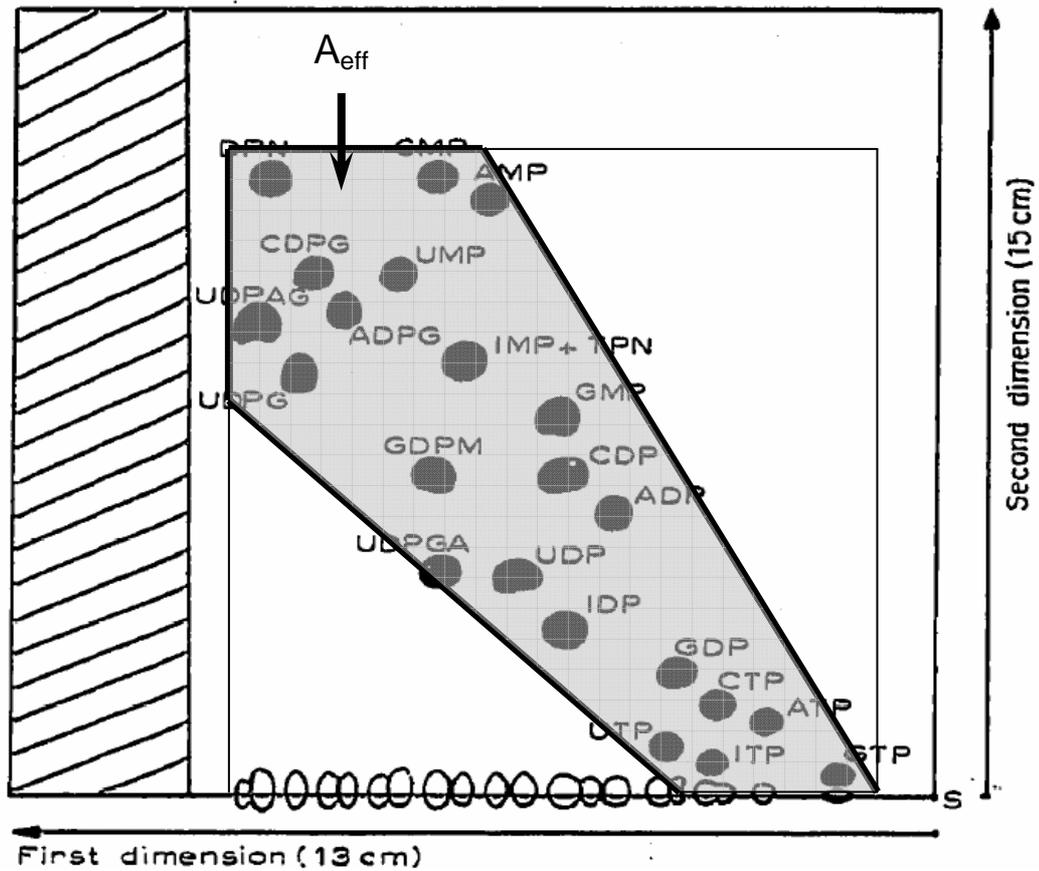


Abbildung 21: Zweidimensionale DC-Analyse von 23 Ribonucleotiden [26]. Erweitert um die geometrische Anordnung FAN

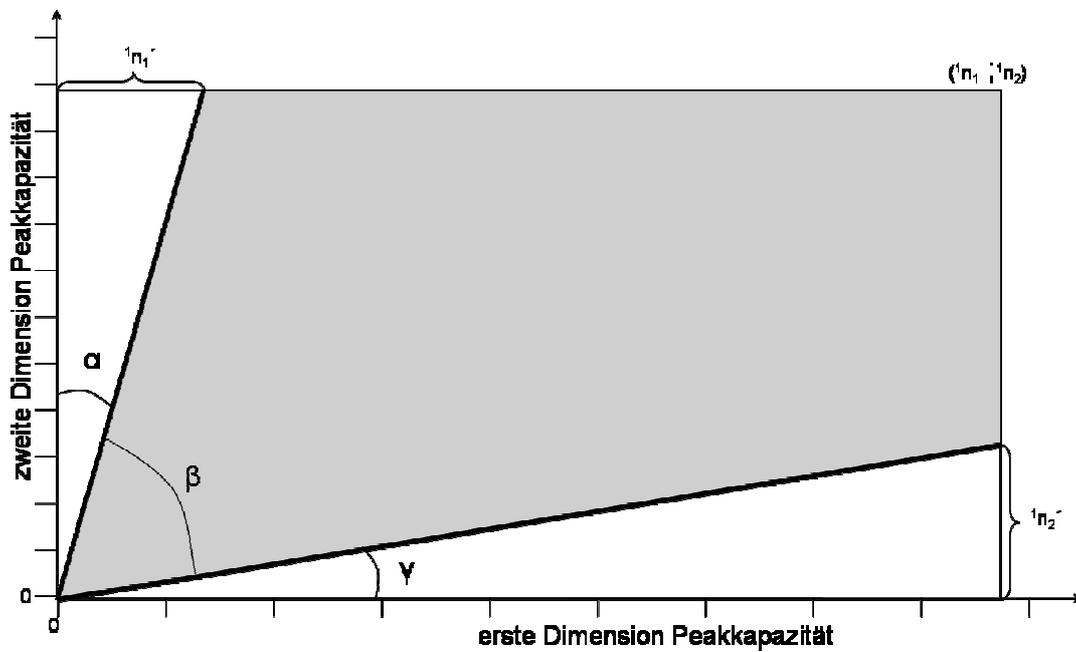


Abbildung 22: Einfluss von nicht-orthogonalen Trennmechanismen in einem zweidimensionalen Chromatogramm mit direkter Korrelation. Gezeigt ist eine schematische zweidimensionale Darstellung einer LC x LC-Analyse mit dem effektiven Winkel β [153]. Alle für die Berechnung der effektiven Fläche nach Liu et. al. [66] notwendigen Größen sind eingezeichnet.

Die Bestimmung der effektiven Fläche erfolgt dort nach Gleichung 14:

$${}^2A_{eff} = {}^1n_1 {}^1n_2 - \frac{1}{2} \left[({}^1n_2)^2 \tan \alpha + ({}^1n_1)^2 \tan \gamma \right]$$

Gleichung 14

Die Methode nach Liu et. al. erlaubt eine direkte Bestimmung der effektiven Fläche für die Anordnungen FAN und deren Sonderform WEG (wedge). Bei komplexeren Anordnungen wie PAR (Parallelogramm) oder der umgekehrten Korrelation BOO (Boomerang), die in Abbildung 20 gezeigt ist, versagt diese Methode zur Berechnung der effektiven Fläche.

Die in dieser Arbeit entwickelte und in Journal of Chromatography A, [154] publizierte Erweiterung der Methode verzichtet auf die direkte Bestimmung der Winkel. Die Bestimmung von $\tan \alpha$ und $\tan \gamma$ erfolgt aus dem Betrachten der geometrischen Anordnung im zweidimensionalen Chromatogramm. Dafür wird die effektive Fläche mit Linien abgegrenzt. Hierdurch entstehen zwei rechtwinklige Dreiecke. In einem rechtwinkligen Dreieck ist der Tangens eines Winkels das Längenverhältnis von Gegenkathete zu Ankathete (Abbildung 22). Somit werden $\tan \alpha$ und $\tan \gamma$ folgendermaßen beschrieben.

$$\tan \alpha = \frac{{}^1n'_1}{{}^1n_2}$$

Gleichung 15

$$\tan \gamma = \frac{{}^1n'_2}{{}^1n_1}$$

Gleichung 16

Durch Einsetzen von ${}^1n'_1$ und ${}^1n'_2$ in die Gleichung nach Liu et al. kann diese vereinfacht werden.

$${}^2A_{eff} = {}^1n_1 {}^1n_2 - \frac{1}{2} \left[{}^1n_2 {}^1n'_1 + {}^1n_1 {}^1n'_2 \right]$$

Gleichung 17

Die Werte für ${}^1n'_1$ und ${}^1n'_2$ können aus dem Chromatogramm leicht abgelesen werden. Diese Methode hat einen weiteren Vorteil: Das Ablesen des richtigen Winkels erfordert eine exakte Skalierung der zweiten Dimension im Verhältnis zur ersten Dimension. Wenn dies nicht beachtet wird, kommt es zu einer Streckung oder Stauchung des Winkels, was zu fehlerhaften Ergebnissen führt. Die vorgestellte Methode ist davon unabhängig.

Die gezeigte Berechnung der effektiven Flächen ist jedoch nur bei der geometrischen Anordnung WEG und FAN zutreffend. Bei komplexeren Strukturen, wie zum Beispiel für ein Parallelogramm (RAR), oder unregelmäßigen Formen ist sie unzureichend [152]. Betrachtet man den aufgespannten Raum nun als ein Vektorfeld, bietet dies eine einfache Methode zur

Berechnung der effektiven Fläche. Der erste Schritt, das zweidimensionale Chromatogramm als Vektorfeld zu definieren, wurden von Liu et. al gezeigt [66]. In Abbildung 23 ist ein unregelmäßiges Viereck als effektive Fläche abgebildet. Dieser zweidimensionale Raum kann durch drei Vektoren beschrieben werden:

$$\vec{a} = \begin{pmatrix} {}^1n^a \\ {}^2n^a \\ 0 \end{pmatrix} \quad \vec{b} = \begin{pmatrix} {}^1n^b \\ {}^2n^b \\ 0 \end{pmatrix} \quad \vec{c} = \begin{pmatrix} {}^1n^c \\ {}^2n^c \\ 0 \end{pmatrix}$$

Laut Definition ist das Kreuzprodukt zweier Vektoren ein dritter Vektor der senkrecht auf der von den beiden ersten Vektoren aufgespannten Fläche steht und mit ihnen ein Rechtssystem bildet. Der Betrag des Vektors entspricht dem Flächeninhalt des Parallelogramms, das von den beiden Vektoren aufgespannt wird [155].

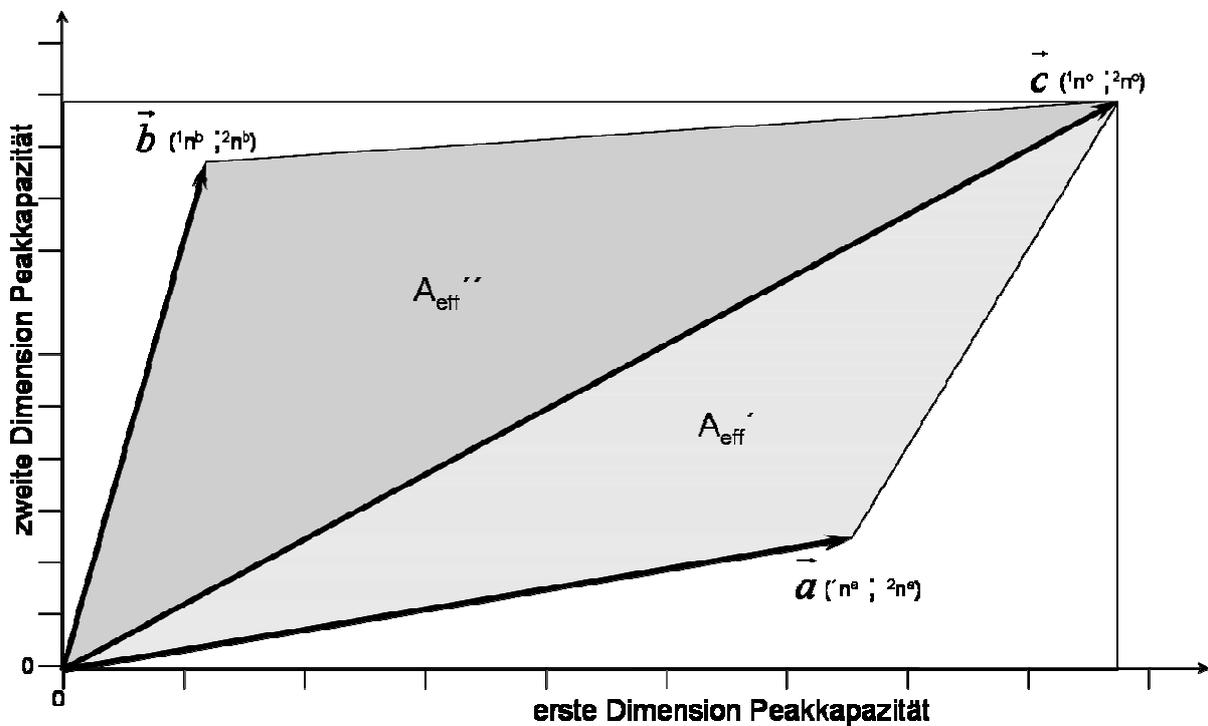


Abbildung 23: Schematische Darstellung eines unregelmäßigen Vierecks im zweidimensionalen Raum, beschrieben durch die Vektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} .

Es können, wie in der Abbildung 23 gezeigt, zwei solcher Systeme gebildet werden.

$$A_{eff}' = \frac{1}{2} A_{\text{Parallelogramm}}' = \frac{1}{2} |\vec{a} \times \vec{c}| \quad A_{eff}'' = \frac{1}{2} A_{\text{Parallelogramm}}'' = \frac{1}{2} |\vec{c} \times \vec{b}|$$

Gleichungen 18

Die Summe der Hälften beider Parallelogramme entspricht der gesamten effektiven Fläche des unregelmäßigen Vierecks.

$$A_{eff} = A_{eff}' + A_{eff}'' = \frac{1}{2} |\vec{a} \times \vec{c}| + \frac{1}{2} |\vec{c} \times \vec{b}|$$

Gleichung 19

Nach dem Auflösen des Kreuzproduktes nimmt die Formel folgende Form an.

$$\begin{aligned} A_{eff} &= \frac{1}{2} |\vec{a} \times \vec{c}| + \frac{1}{2} |\vec{c} \times \vec{b}| = \frac{1}{2} \left| \begin{pmatrix} {}^1n^a \\ {}^2n^a \\ 0 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} {}^1n^c \\ {}^2n^c \\ 0 \end{pmatrix} \right| + \frac{1}{2} \left| \begin{pmatrix} {}^1n^c \\ {}^2n^c \\ 0 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} {}^1n^b \\ {}^2n^b \\ 0 \end{pmatrix} \right| \\ &= \frac{1}{2} \left| \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ {}^1n^a \cdot {}^2n^c - {}^2n^a \cdot {}^1n^c \end{pmatrix} \right| + \frac{1}{2} \left| \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ {}^1n^c \cdot {}^2n^b - {}^2n^c \cdot {}^1n^b \end{pmatrix} \right| \\ &= \frac{1}{2} \left| ({}^1n^a \cdot {}^2n^c - {}^2n^a \cdot {}^1n^c) \right| + \frac{1}{2} \left| ({}^1n^c \cdot {}^2n^b - {}^2n^c \cdot {}^1n^b) \right| \\ &= \frac{1}{2} \left[({}^1n^a - {}^1n^b)^2 n^c + ({}^2n^b - {}^2n^a)^2 n^c \right] \end{aligned}$$

Gleichung 20

Unter der Beachtung der Rechte-Hand-Regel werden positive Flächen erhalten [155]. Der Ausdruck kann deshalb, wie im letzten Schritt gezeigt, vereinfacht werden. Diese Vorgehensweise ist nicht mit mehr Aufwand verbunden, bietet aber auf eine einfache Art und Weise die Möglichkeit, die Peakkapazität verschiedenförmiger effektiver Flächen zu berechnen. Diese Methode ist auch auf Verteilungsmuster mit mehr als vier Ecken anwendbar.

Mit der definierten effektiven Fläche ist es nun möglich den Grad der Orthogonalität zu berechnen. Die Orthogonalität wird als Quotient von der effektiven Fläche und der theoretisch möglichen Fläche wie folgt berechnet [65]:

$$O = \frac{A_{eff}}{{}^1n_{grd} \cdot {}^2n_{grd}}$$

Gleichung 21

Die Orthogonalität ist eine einheitslose Größe und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Die effektive Fläche wird aus den Peakkapazitäten der ersten und der zweiten Dimension berechnet, ist jedoch nicht mit der Peakkapazität der zweidimensionalen Methode

gleichzusetzen. Hierfür müssen noch weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Trennung haben, berücksichtigt werden.

4.2.2 Berechnung der Peakkapazität

Der Einfluss der Korrelationen der Trennmechanismen auf die Trenneffizienz wurde in Abschnitt 4.2.1 beschrieben. Die dort vorgestellte Methode zur Berechnung der effektiven Fläche gibt eine Möglichkeit den Grad der Orthogonalität zu quantifizieren. Die effektive Fläche selbst ist bereits die Peakkapazität für eine voll comprehensive zweidimensionale Methode wie z. B. DC x DC. In diesem Fall würde die Gleichung 22 gelten:

$${}^2n = A_{eff}$$

Gleichung 22

Aufgrund der Modulation müssen jedoch noch andere Faktoren berücksichtigt werden.

4.2.2.1 Berechnungen der Peakkapazität der ersten und der zweiten Dimension in einem zweidimensionalen Chromatogramm

Die Peakkapazität der ersten Dimension sollte aus der eindimensionalen Analyse bestimmt werden. Ist dies nicht möglich, da eine solche Analyse nicht durchgeführt wurde, kann eine an Murphy et. al. [45] angelehnte Methode angewendet werden. Mit dieser Methode lassen sich die Peakbreiten in der ersten Dimension aus einer zweidimensionalen Analyse berechnen. Es wurde gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Modulationen pro Peak der ersten Dimension und der Standardabweichung von diesem Peak besteht.

Für vier oder weniger Modulationen pro Peak hat der Startpunkt der Fraktionierung des Peaks starke Auswirkungen auf die Zahl der Modulationen (siehe Abschnitt 2.1.3).

Betrachtet man aber eine ausreichende Anzahl an Spots in der zweidimensionalen Analyse, kann die Peakbreite der Peaks in der ersten Dimension sehr gut geschätzt werden. Der mathematische Zusammenhang kann durch Gleichungen 23 und 24 angegeben werden.

$${}^1\sigma = \frac{P_M}{2,14 * \frac{1}{M'} + 0,80} \quad {}^1w_b = 4 {}^1\sigma = \frac{4P_M}{2,14 * \frac{1}{M'} + 0,80}$$

Gleichung 23

Gleichung 24

M' entspricht dabei der mittleren Anzahl der Modulationen pro Peak nach der ersten Dimension. Je öfter der Peak der ersten Dimension moduliert wurde, desto genauer ist der durch diese Gleichung berechneter Wert. Die erhaltene mittlere Peakbreite kann in Gleichung 11 eingesetzt und die Peakkapazität der ersten Dimension berechnet werden.

Die Peakkapazität der zweiten Dimension muss aus dem zweidimensionalen Chromatogramm bestimmt werden. Der Einfluss der Modulation und des Injektionsvolumen auf die anschließende Trennung in der zweiten Dimension fließt unmittelbar in die Peakkapazität der zweiten Dimension ein. Auf diesem Weg werden alle Verbreiterungsfaktoren mit berücksichtigt.

4.2.2.2 Berechnung der Peakkapazität für ein zweidimensionales Chromatogramm

Gleichung 22 muss für die Berechnung der Peakkapazität erweitert werden, denn bei völlig komprehensiven zweidimensionalen Trennungen steigt die Trennleistung zusätzlich wie in Abbildung 24 gezeigt ist [45]. Die Auflösung zweier benachbarter Peaks in einem zweidimensionalen Raum wird erhöht. Mathematisch kann dieser Zusammenhang angelehnt an den Satz des Pythagoras folgendermaßen beschrieben werden [45]:

$$R_{S(ges)} = \sqrt{R_{S1.D}^2 + R_{S2.D}^2}$$

Gleichung 25

Die gewonnene höhere Trennleistung spiegelt sich natürlich auch in der

Steigerung der Peakkapazität wider. Hierfür schlägt Blumberg die Verwendung des Faktors 1,27 vor. Der Faktor entspricht dem Flächenunterschied zwischen einem Quadrat und einem Kreis [156].

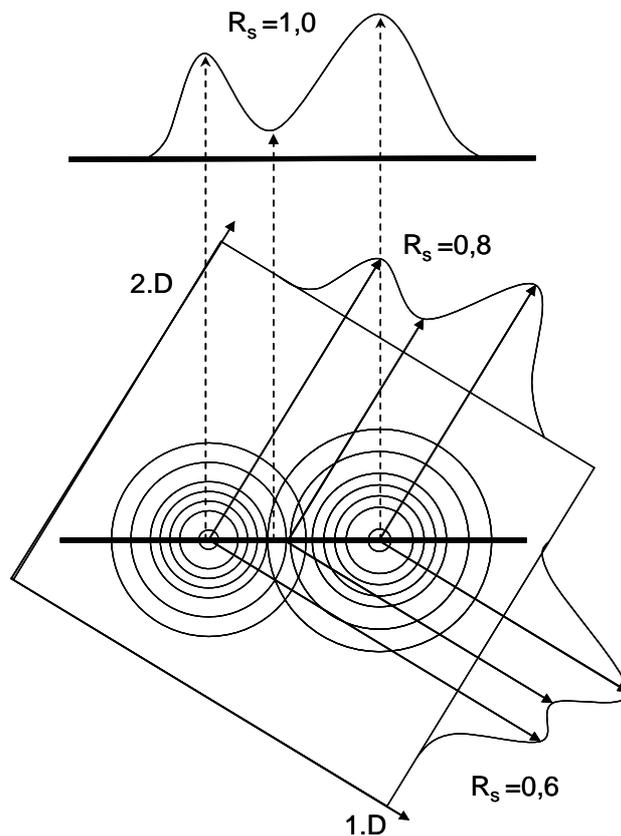


Abbildung 24: Schematische Darstellung von der Auflösung zweier Peaks in komprehensiven zweidimensionalen Analyse, nach [45].

Bei der LC x LC handelt es sich dagegen nur näherungsweise um eine comprehensive zweidimensionale Methode, sodass dieser Effekt ist vernachlässigbar gering ist.

Die Peakkapazität wird durch die Peaksverbreiterung in den Schleifen bei der Modulation verringert. Die durch die Fraktionierung entstandene Peakverbreiterung kann aus dem Verhältnis der Fraktionierung zur Peakbreite in der ersten Dimension bestimmt werden und wird durch den Nobuofaktor $1/\langle\sigma^*\rangle$ beschrieben [123].

$${}^2n = A_{eff} * \frac{1}{\langle\sigma^*\rangle} = A_{eff} * \frac{1}{\sqrt{1 + 0,21\left(\frac{P_M}{\sigma}\right)^2}} = A_{eff} * \frac{1}{\sqrt{1 + 3,35\left(\frac{P_M}{\sigma}\right)^2}}$$

Gleichung 26

Mit dieser Formel ist es nun möglich die korrekte Peakkapazität eines zweidimensionalen Chromatogramms zu bestimmen. Diese berücksichtigt sowohl die Orthogonalität der Methode als auch den Verlust der Peakkapazität durch die Modulation.

4.2.3 Analyse von *Radix Angelicae sinensis* mit drei unterschiedlichen Säulenkombinationen

Bei der Säulenwahl für das LC x LC-System werden hier als Leistungsparametern die Orthogonalität und die Peakkapazität herangezogen. Ein Extrakt von *Radix Angelicae sinensis* wurde als Beispiel für eine komplexe Probe eingesetzt. Um die Vergleichbarkeit der Methoden zu gewährleisten, wurden die Analysen mit vollkommen identischen Versuchsparametern durchgeführt. Der Unterschied bestand in der Variation der ersten Dimension.

- A Nucleodur[®] 100-3CN-RP 3 µm, 250 x 2,0 mm
- B Luna[®] 3µ CN 100 A 3 µm 150 x 2,0 mm
- C Kinetex[®] 1,7µ PFP, 100 A 1,7 µm 150 x 2,1 mm

Bei allen drei Säulenkombinationen wurde dergleiche Gradient in der ersten und in der zweiten Dimension verwendet (Tabelle 7). Das Säulenmaterial der drei Säulen wurde bereits mit dem Neue-Test untersucht. In allen drei Fällen wurden Selektivitätsunterschiede zur Kinetex[®] RP18-Säule festgestellt. Aus diesem Grund wurde in der zweiten Dimension immer die Kinetex[®] 2,6 µ C18 100A 2,6 µm 50 x 3,0 mm eingesetzt.

Tabelle 7: Gradienten in der ersten und in der zweiten Dimension. Der Gradient der zweiten Dimension wurde 300-mal pro Analyse wiederholt.

Erste Dimension		
Zeit	Acetonitril	H ₂ O
[min]	[%]	[%]
0	0	100
50	0	100
150	25	75
270	90	10
300	90	10

Zweite Dimension			
Zeit	H ₂ O	MeOH	1 % HCOOH
[min]	[%]	[%]	[%]
1,01	85	10	5
1,05	85	10	5
1,70	25	70	5
1,75	45	90	5
1,80	5	90	5
1,85	85	10	5
2,00	85	10	5

So kann die erwartete Orthogonalität, basierend auf dem Neue-Test, und die tatsächliche Orthogonalität, bestimmt mit einer realen Probe, verglichen werden. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass die tatsächlich erzielte Orthogonalität nur für die untersuchte Probe angegeben werden kann.

Zur Beurteilung der Orthogonalität und der Peakkapazität wurden zwei Verfahren angewendet. Zum einen wurde die Bestimmung der effektiven Fläche nach Liu [66] (Gleichung 17; Methode 1) zum anderen das Verfahren, das im Abschnitt 4.2.1 vorgestellt wurde (Gleichung 20; Methode 2), durchgeführt. Abbildung 25 zeigt die drei Chromatogramme, die durch die unterschiedlichen Säulenkombinationen resultieren. Auf der linken Seite ist die effektive Fläche nach der Methode 1 und rechts nach der Methode 2 eingezeichnet.

Die Peakverteilungen in allen drei Chromatogrammen folgen der direkten Korrelation und können unter der Anordnung FAN zusammengefasst werden. Dieses Verhalten war so auch zu erwarten, denn bei allen Phasen handelt es sich um Umkehrphasen. Aus diesem Grund ist es zulässig, die Methode 1 zur Bestimmung der Orthogonalität und der effektiven Fläche anzuwenden.

In der Tabelle 8 und 9 sind die Ergebnisse der Bestimmung der effektiven Fläche und der Orthogonalität aufgelistet:

Tabelle 8: Bestimmung der effektiven Fläche und der Orthogonalität nach Methode 1

	Peakbreite 1 Dim. [min]	$^1n_{\text{grd}}$	$^2n_{\text{grd}}$	$^1n'$	$^2n'$	A_{eff}	O
A	3,0	85	13	1,75	9,98	669	0,61
B	2,5	96	13	1,88	10,27	743	0,60
C	2,3	108	13	2,12	9,64	870	0,62

Säulenkombinationen: A) Nucleodur[®] x Kinetex[®] RP18; B) Luna[®] x Kinetex[®] RP18; C) Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18

Tabelle 9: Bestimmung der effektiven Fläche und der Orthogonalität nach Methode 2

	Peakbreite 1 Dim. [min]	$^1n^a$	$^2n^a$	$^1n^b$	$^2n^b$	$^1n^c$	$^2n^c$	A_{eff}	O
A	3,0	85	10	1,75	13	85	13	669	0,61
B	2,5	96	10,3	1,88	10,7	96	13	631	0,51
C	2,3	42,3	0,7	2,12	9,9	108	13	758	0,54

Säulenkombination: A) Nucleodur[®] x Kinetex[®] RP18; B) Luna[®] x Kinetex[®] RP18; C) Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18

Für die Säulenkombination A (Nucleodur[®] CN x RP18) sind die berechneten effektiven Flächen und die Orthogonalität bei beiden Methoden identisch. In beiden Fällen wurde die gleiche Fläche eingezeichnet und berechnet, weshalb sich beide Methoden zur Bestimmung der effektiven Fläche bei dieser Verteilung eignen. Anders sieht es für die Kombination B aus. Mit der Methode 2 (rechts) kann die Fläche besser an die tatsächliche Peakverteilung angepasst werden. So wird zwar eine kleinere Fläche eingegrenzt, jedoch entspricht diese jetzt mehr der tatsächlichen Peakverteilung. Die Orthogonalität und die später berechnete Peakkapazität werden dadurch entsprechend geringer.

Der Vergleich der beiden Trennungen der *Radix Angelicae sinensis*-Probe mit den verschiedenen Cyanophasen in der ersten Dimension (Säulenkombinationen A und B) zeigt deutliche Unterschiede, je nachdem welche Bestimmungsmethode angewendet wurde. Nach der Methode 1 liefert die Säulenkombination B (Luna CN[®] x RP18) eine größere effektive Fläche als die Kombination A. Die Orthogonalitäten sind aber in beiden Fällen vergleichbar. Somit wäre die Säulenkombination B die bessere Wahl. Nach Methode 2 zeigt sich ein anderes Bild. Es werden geringere Werte für A_{eff} und O bei Säulenkombination B berechnet. Die deutlich höhere Orthogonalität bei der Säulenkombination A gleicht den Nachteil der geringeren Trennleistung in der ersten Dimension ($^1n_{\text{grd}}$ 85 bzw. 96) mehr als aus. So kann die bessere Säulenkombination erst durch den Einsatz der Bestimmungsmethode 2 korrekt identifiziert werden.

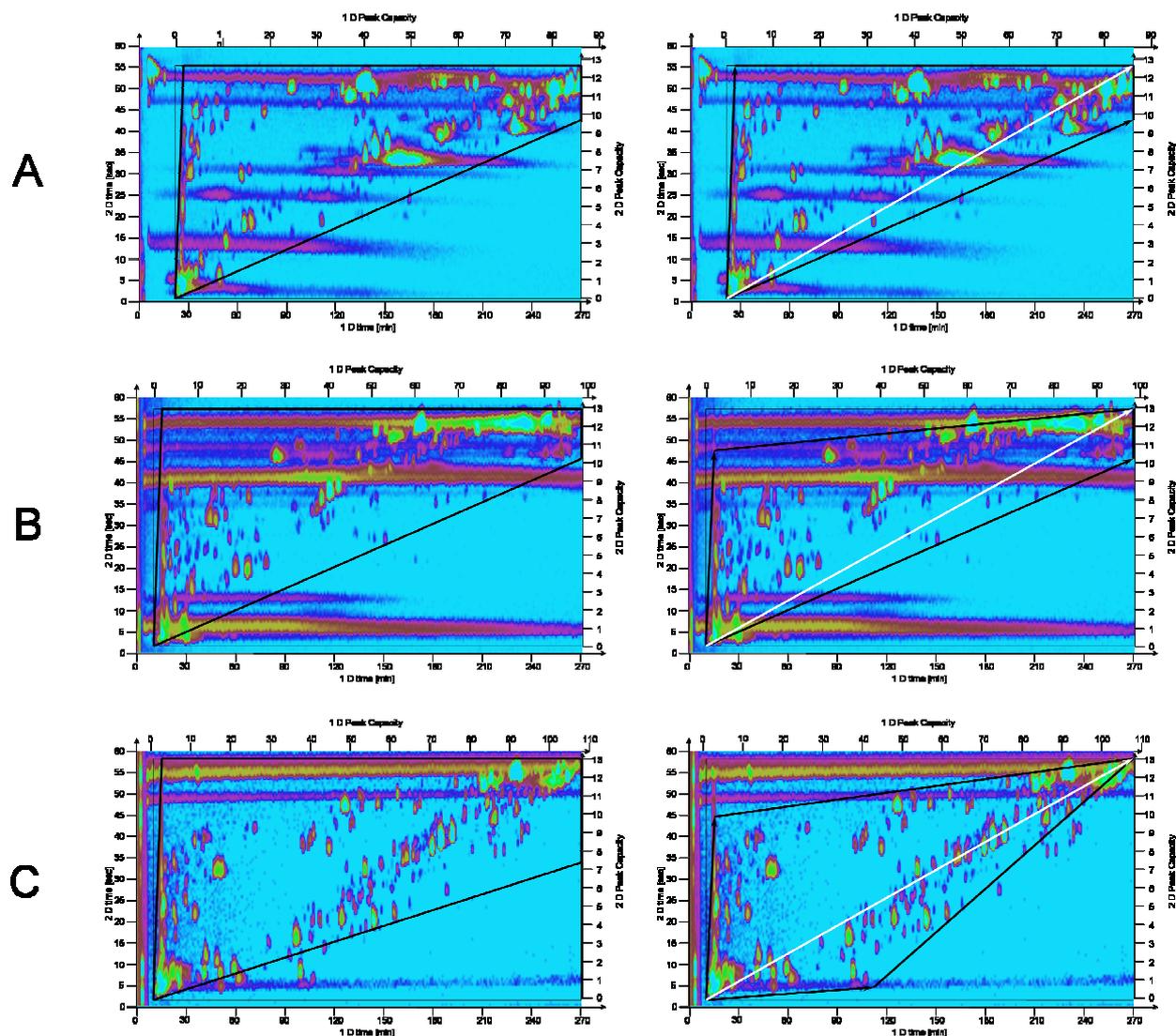


Abbildung 25: LC x LC-Analyse eines Extraktes von *Radix Angelicae sinensis* mit drei unterschiedlichen Säulenkombinationen. A) Nucleodur® x Kinetex® RP18; B) Luna® x Kinetex® RP18; C) Kinetex® PFP x Kinetex® RP18. Links ist die Bestimmung der effektiven Fläche nach Liu et al [66] und rechts die Bestimmung der effektiven Fläche unter der Verwendung der Vektoren gezeigt. TIC, Detektion erfolgte mit qTOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) im ESI positiv Modus.

Die höhere Orthogonalität der Nucleodur® CN x Kinetex® RP18 Kopplung im Vergleich zur Luna® CN x Kinetex® RP18 ist im Hinblick auf die Ergebnissen des Neue-Tests überraschend. Die einzelnen Wechselwirkungen der Nucleodur CN unterscheiden sich weniger stark von der Kinetex® RP18 als die der Luna® CN. Es muss dabei aber berücksichtigt werden, dass die effektive Fläche und die Orthogonalität von der Probe abhängig sind. Die Analyse anderer Proben könnte ein anderes Ergebnis liefern. Für die Untersuchung der *Radix Angelicae sinensis* eignet sich die Kombination Nucleodur® CN x Kinetex® RP18 besser als die Säulenkombination Luna® CN x Kinetex® RP18.

Die effektive Fläche der Säulenkombination C (Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18) wird auch mit der Bestimmungsmethode 2 nicht korrekt beschrieben. Eine Gruppe von Spots befindet sich außerhalb des eingegrenzten Bereichs (Abbildung 25). An dieser Stelle zeigen sich die Vorteile der vektorbasierten Methode. Die Peakverteilung bei der Analyse mit Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18 kann am besten durch ein unregelmäßiges Fünfeck beschrieben werden. Dieses ist in Abbildung 26 gezeigt. Die Gleichung 20 kann in diesem Fall nicht mehr angewendet werden. Die allgemeine Formel zur Berechnung der effektiven Fläche erlaubt dennoch die Bestimmung.

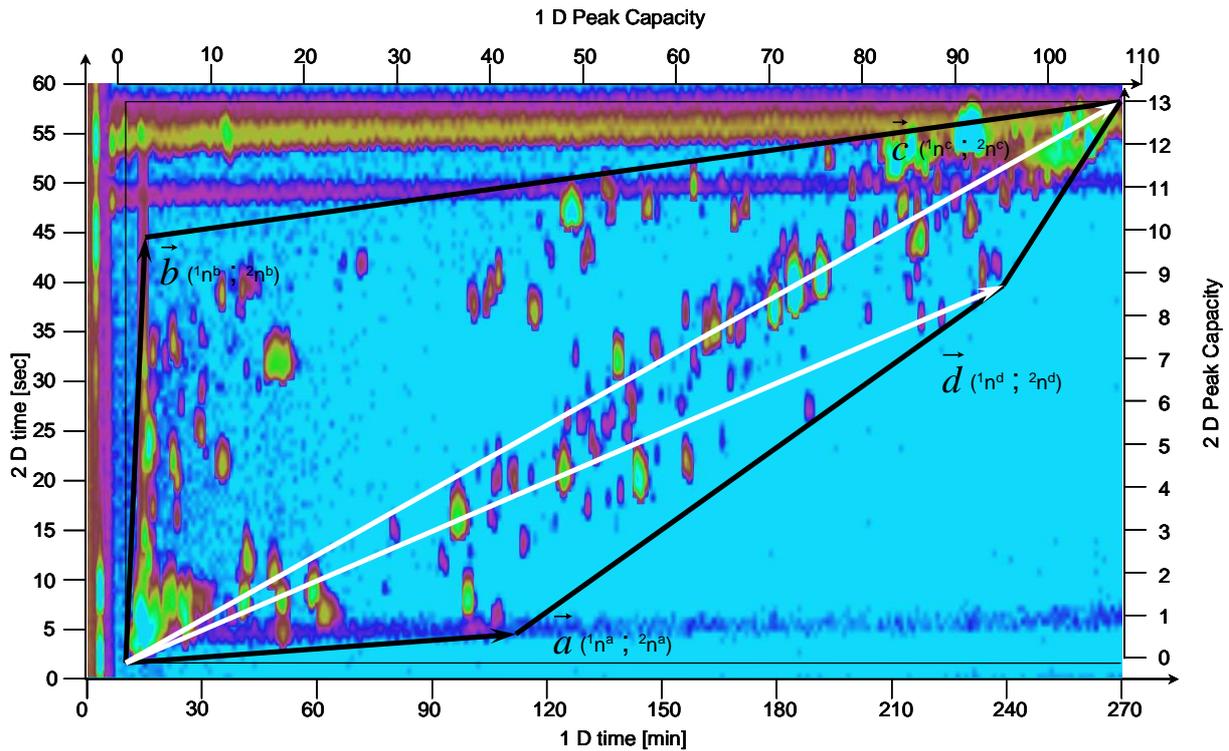


Abbildung 26: LC x LC-Analyse eines Extraktes von *Radix Angelicae sinensis* mit der Säulenkombination Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18. Die effektive Peakfläche wird durch ein unregelmäßiges Fünfeck beschrieben. TIC, die Detektion erfolgte mit einem qTOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) im ESI-positiv Modus.

Da ein Fünfeck mit vier Vektoren und den daraus resultierenden drei Dreiecken beschrieben werden kann, setzt sich die effektive Fläche aus drei Termen zusammen.

$$A_{eff} = \frac{1}{2} |\vec{a} \times \vec{d}| + \frac{1}{2} |\vec{d} \times \vec{c}| + \frac{1}{2} |\vec{c} \times \vec{b}|$$

Gleichung 27

Nach dem Auflösen der Gleichung wird Gleichung 28 erhalten:

$$A_{eff} = \frac{1}{2} |(1n^a \cdot 2n^d - 2n^a \cdot 1n^d)| + \frac{1}{2} |(1n^d \cdot 2n^c - 2n^d \cdot 1n^c)| + \frac{1}{2} |(1n^c \cdot 2n^b - 2n^c \cdot 1n^b)|.$$

Gleichung 28

Mit dieser Gleichung ist es möglich die effektive Fläche für die Kopplung Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18 zu berechnen. Die effektive Fläche nach Gleichung 28 beträgt **845** und die Orthogonalität **0,60**. In Tabelle 10 sind die effektive Fläche und die Orthogonalität dieser Säulenkombination, berechnet mit den unterschiedlichen Methoden, zusammengefasst.

Tabelle 10: Vergleich der effektiven Flächen und der Orthogonalität für die Säulenkombination PFP x RP18.

Methode	A _{eff}	O
Methode 1	870	0,62
Methode 2	758	0,54
Fünfeckiges Vektormodel	845	0,60

Durch das Erweitern der effektiven Fläche um den Faktor $\langle\sigma^*\rangle^{-1}$ ergibt sich die Peakkapazität. Die Ergebnisse der drei Säulenkombinationen, berechnet mit der optimierten Vektormethode, sind in Tabelle 11 zusammen gefasst.

Tabelle 11: Vergleich dreier Säulenkombinationen zur Untersuchung eines Extraktes von *Radix Angelicae sinensis*.

erste Dimension					zweite Dimension (Kinetex [®] RP18)							
Phase	L [mm]	ID [mm]	Part. [µm]	¹ n _{grd}	L [mm]	ID [mm]	Part. [µm]	² n _{grd}	A _{eff}	O	$\frac{1}{\langle\sigma^*\rangle}$	^{2D} n
Nucleodur [®]	250	2	3	85					669	0,61	0,853	571
Luna [®]	150	2	3	96	50	3	2.6	13	631	0,51	0,806	509
Kinetex [®] PFP	150	2,1	1,7	108					845	0,60	0,782	661

Trotz der etwas schlechteren Orthogonalität im Vergleich zur Kombination Nucleodur[®] CN x Kinetex[®] RP18 führt die größere eindimensionale Trennleistung der Kinetex[®] PFP-Säule in der 1. Dimension zu einer höheren Peakkapazität des Gesamtsystems. Die Ergebnisse des Neue-Tests belegen eine hohe Ähnlichkeit der PFP- mit der RP18-Phase. Trotzdem zeigt diese Säulenkombination eine gute Orthogonalität bei der Untersuchung des Extraktes der *Radix Angelicae sinensis*. Somit kann der Neue-Test zwar eine Einschätzung zur möglichen Orthogonalität geben, die tatsächliche Orthogonalität kann aber erst durch die LC x LC-Analyse mit der gegebenen Probe bestimmt werden.

Die Säulenkombination Kinetex® PFP x Kinetex® RP18 liefert für die Analyse von *Radix Angelicae sinensis* das beste Ergebnis. Aus diesem Grund wurde bei den weiterführenden Analysen diese Säulenkombination eingesetzt.

Die Ergebnisse der Arbeit, die im diesem Kapitel präsentiert wurden, sind bereits in Journal of Chromatography A [154] publiziert worden.

4.2.4 Vergleich von on-line und off-line LC x LC

In diesem Abschnitt wird ein Vergleich von zwei comprehensiven zweidimensionalen Methoden gezeigt. Wie schon in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben, kann die LC x LC sowohl als on-line als auch off-line Technik betrieben werden. Beide Techniken haben ihre Vor- und Nachteile. Diese werden hier anhand der Analyse eines Extraktes von *Radix Angelicae sinensis* genauer untersucht.

Es werden mehrere Parameter zur Beschreibung der Qualität der Analysen herangezogen. An erster Stelle steht die Peakkapazität, sie ist der entscheidende Faktor, um die Qualität der Analyse einzuschätzen. Es müssen aber auch weitere Faktoren, wie die Analysenzeit und der Verbrauch der Lösungsmittel.

Es wird die im vorherigen Kapitel als leistungsstärkste identifizierte Methode mit einer off-line LC x LC-Methode verglichen. Der Anspruch der sehr schnellen Analyse in der zweiten Dimension ist bei off-line-Techniken nicht gegeben. So wurde die Gradientenzeit von 1 auf 15 Minuten verlängert (Abbildung 27), was in einer deutlichen Steigerung der Peakkapazität in der zweiten Dimension resultiert. Gleichzeitig konnte der Fluss in der ersten Dimension erhöht werden (von 0,025 mL/min auf 0,0625 mL/min). Der höhere Fluss verkürzt die Analysenzeit in der ersten Dimension und verbessert die Trennleistung der Säule. Dem Eluat der ersten Dimension wurde zusätzlich noch 0,0375 mL/min 1 %ige Ameisensäure zugesetzt. Durch die Ameisensäure wurden die Fraktionen auf den gleichen pH-Wert der zweiten Dimension eingestellt. Die gleichzeitige Erhöhung der Polarität führte zu einer Reduzierung der Elutionskraft des Lösungsmittels in den Fraktionen. Die Zugabe nach der ersten Dimension kann in der on-line Variante nicht realisiert werden, da es dadurch zu einer Erhöhung des Fraktionsvolumens kommen würde. Außerdem erhöhte die Zugabe den Gesamtfluss und vereinfacht die Fraktionierung mittels Fraktionssammler. Die Sammeldauer einer Fraktion betrug ein Minute. Bei einem Gesamtfluss von 0,100 mL/min konnten 4 bis 5 Tropfen pro Fraktion gesammelt werden.

Um die Vergleichbarkeit der Methoden bei der Detektion mit dem MS sicherzustellen, mussten diverse Parameter an mehreren Stellen angepasst werden. So wurde sichergestellt, dass der Fluss zur Ionenquelle und die relative Konzentration bei beiden Methoden in etwa gleich waren. Die genaue Methodenbeschreibung ist im experimentellen Teil zu finden (Seite 100).

Das entwickelte Verfahren zur Bestimmung der Peakkapazität für die on-line LC x LC kann auch für die Auswertung der off-line LC x LC-Chromatogramme eingesetzt werden. Abweichend zu den on-line-Messungen konnten die Chromatogramme der off-line-Messungen nur mit einer auf Basis von Labview geschriebenen Software ausgewertet und dargestellt werden.

In Abbildung 27 ist eine zweidimensionale Darstellung der off-line LC x LC-Analyse von *Radix Angelicae sinensis* gezeigt. Die Peakverteilung in dem zweidimensionalen Chromatogramm stimmt gut mit der on-line LC x LC-Analyse überein (Abbildung 26). Die sichtbaren Unterschiede entstehen durch den relativ langsamen Gradienten in der zweiten Dimension.

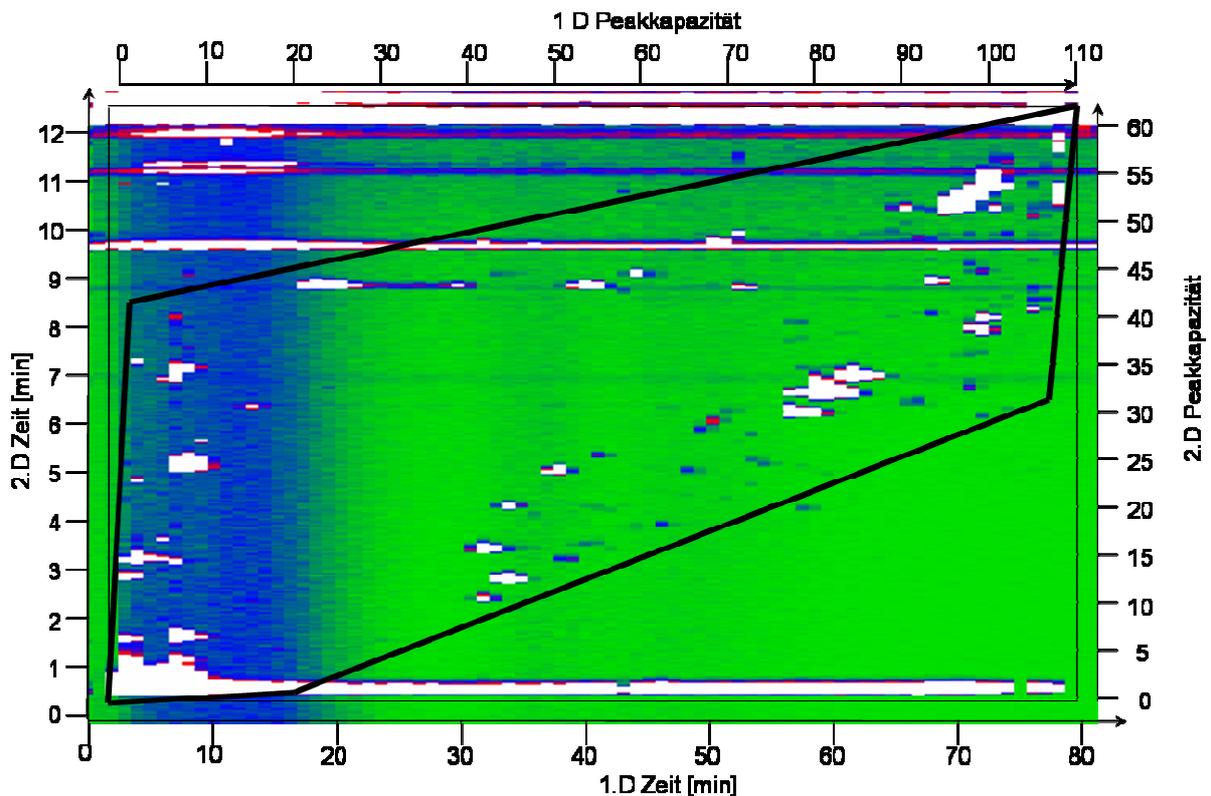


Abbildung 27: off-line LC x LC-Analyse von *Radix Angelicae sinensis* mit der Säulenkombination Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18. Die effektive Peakfläche wird durch ein unregelmäßiges Fünfeck beschrieben. TIC, die Detektion erfolgte mit einem qTOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) im ESI-positiv Modus.

Vergleicht man die Orthogonalität und die Peakkapazität beider Verfahren, ist zu erkennen, dass exakt dieselbe Orthogonalität erreicht wird (Tabelle 12). Die errechneten Peakkapazitäten unterscheiden sich dagegen deutlich. Die mit der off-line Methode erzielte Peakkapazität übersteigt die der on-line Methode um mehr als das Vierfache. Der Grund dafür ist die deutliche Steigerung der Peakkapazität in der zweiten Dimension.

Tabelle 12: Vergleich der on-line und der off-line LC x LC-Methode. Bei der Analyse des Extraktes von *Radix Angelicae sinensis* anhand der Peakkapazität und der Orthogonalität.

LC x LC Methode	erste Dimension (Kinetex® PFP)		zweite Dimension (Kinetex® RP18)		A _{eff}	O	(σ*) ⁻¹	2 ^D n
	Mittelwert der Peakbreiten [min]	¹ n _{grd}	Mittelwert der Peakbreiten [min]	² n _{grd}				
on-line	2,5	108	0,07	13	845	0,60	0,782	661
off-line	1,4	110	0,18	67	4416	0,60	0,608	2683

In dem gezeigten Vergleich ist der Verbrauch an Eluent in beiden Verfahren nahezu identisch (Tabelle 13). Der Nachteil der off-line Methode ist die lange Analysenzeit. Es wäre möglich die Peakkapazität in der off-line Methode noch weiter zu steigern z.B. durch häufigeres Fraktionieren oder eine noch bessere Trennung in der zweiten Dimension. Dies geht allerdings mit noch längeren Analysenzeiten oder einem höheren Eluentenverbrauch einher. Ein weiterer Faktor ist die Zwischenlagerung der Fraktionen. In dieser Zeit können Analyten ausdampfen oder abgebaut werden. Das ist auch der wahrscheinliche Grund für die geringere Anzahl der detektierten Spots im off-line LC x LC-Chromatogramm.

Tabelle 13: Vergleich der on-line und off-line LC x LC-Methode zur Analyse von *Radix Angelicae sinensis* anhand der Peakkapazität, der Analysenzeit, des Eluentenverbrauchs (ACN und MeOH) und der Anzahl der detektierten Spots.

LC x LC Methode	2 ^D n	Zeit [h]	Eluent [mL]	Anzahl der detektierten Spots
on-line	661	5	240	ca. 170
off-line	2683	28	247	ca. 120

Die on-line LC x LC bietet somit eine gute Alternative zu off-line Methoden, um in einer deutlich kürzeren Zeit eine Analyse mit guter Trennleistung ohne Verlust an Analyten durchzuführen. Eine deutliche Steigerung der Trennleistung kann jedoch mit off-line Methoden erzielt werden.

4.3 Experimenteller Aufbau eines IC-LC x LC-HPLC Systems unter Verwendung der Ionenaustauschchromatographie und der Umkehrphasenchromatographie

In dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, mit der sowohl die phenolischen Säuren als auch die Polyphenole im Wein bestimmt werden können. Die komplexe Weinmatrix erschwert die Analyse jedoch. Um die große Anzahl der Substanzen zu trennen und diese dann zu identifizieren, wurde eine IC-LC x LC-Technik entwickelt.

Eine LC x LC-Analyse von Wein ist aufgrund der ionischen und polaren Substanzen schwierig. Die bisherigen literaturbelegten Analysen mit LC x LC zeigen die Problematik. Die Trennung der phenolischen Komponenten mit zwei Umkehrphasen (Phenyl-Phase und RP18) liefert nur bedingt gute Ergebnisse [120]. Der Grund dafür ist der geringe Unterschied in der Selektivität der Phasen. Die Kopplung von Cyano- oder Aminophasen mit RP18 zur LC x LC-Analyse von Wein ist ebenfalls mit Problemen verbunden. So kann nur eine der beiden Substanzgruppen in der gegebenen Zeit ausreichend gut getrennt werden [117]. Der Einsatz von RP18-Säulen in beiden Dimensionen unter Verwendung eines Ionenpaarreagenzes lieferte dagegen eine gute Orthogonalität. Die Trennleistung war jedoch nur gering [117]. Ein weiteres Problem dieser Methode ist die Anwesenheit des Ionenpaarreagenzes und dadurch eine entstehende Störung bei der Kopplung des chromatographischen Systems mit dem MS.

In dieser Arbeit wurde ein anderer Weg gegangen. Es wurde in der ersten Dimension eine Kombination aus Ionenaustauschchromatographie (IC) und Umkehrphasenchromatographie (PFP) und in der zweiten Dimension eine RP18-Säule eingesetzt. Die Orthogonalität der Umkehrphasenchromatographie zu der Ionenaustauschchromatographie sollte sehr hoch sein [157], da die Trennungsmechanismen in den beiden Dimensionen vollkommen unterschiedlich sind. Grundsätzlich können in der IC nur Ionen aufgrund unterschiedlich starker ionischer Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial (Ionentauscher) getrennt werden, während RP18-Säulen hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen trennen. Zudem ist der verwendete wässrige Eluent in der IC in der RP-Chromatographie nur ein sehr schwacher Eluent, so kommt es zu Fokussierungseffekten am Anfang der zweiten Säule. Dieses Verhalten erlaubt das Sammeln eines größeren Eluatvolumens aus der ersten Dimension bevor dieses in die zweite Dimension injiziert wird.

Es bestehen aber auch Hindernisse, die die Kopplung dieser Techniken erschweren. Das wichtigste Anwendungsgebiet der IC ist die Analyse von anorganischen Anionen und

Kationen [158]. Daneben wird die IC zur Analyse von kleineren organischen Anionen [159, 160], Phosphorglycosiden [161] oder Proteinen [162] eingesetzt. Die Analyse von ungeladenen Analyten ist jedoch nicht möglich. Bei organischen Ionen mit einem großen organischen Rest macht sich die ionische Natur des Analyten weniger stark bemerkbar. Dies wirkt sich auf die Wechselwirkungen mit dem Ionentauscher aus [163].

In der Regel wird die IC bei höheren pH-Werten betrieben, deshalb besteht das Trägermaterial der Säulen aus Polymeren wie z.B. Poly(Styrendivinylnbenzol) [158]. Das Trägermaterial auf Kieselgelbasis wäre bei diesem pH-Wert nicht stabil. Diese Materialien können jedoch sekundäre, hydrophobe Wechselwirkungen mit den Analyten eingehen. Wie Vorversuche gezeigt haben, kommt es dadurch zu einer starken Retentionszeiterhöhung, Tailing und eine damit verbundener Peakverbreiterung. Durch Zugabe eines organischen Modifiers (20 % ACN) können diese Effekte reduziert werden und die Analyse von phenolischen Säuren mit der IC ermöglichen [157, 164].

Die höheren organischen Anteile im Eluent der ersten Dimension führen zur Reduzierung der Fokussierungseffekte auf der zweiten Dimension. Gleichzeitig ist die Stabilität der Säulen auf Polymerbasis herabgesetzt. Bei der verwendeten Säule SUPP 16 von Metrohm auf Poly(Styrendivinylnbenzol)-Basis war der Anteil des organischen Modifiers auf 10 % begrenzt. Das könnte auch der Grund dafür sein, dass bisher die zweidimensionale Kopplungen der IC in der ersten Dimension mit Umkehrphasen in der zweiten Dimension auf die Analysen von kleineren organischen Säuren [165] oder Proteinen [52, 166, 167] beschränkt ist. Dieses Problem kann durch den Einsatz der von Ionenausschlusschromatographie in der ersten Dimension umgangen werden [168].

In dieser Arbeit wurde ein anderer Weg gewählt. Es wurde auf die Verwendung von IC-Säulen auf Polymerbasis verzichtet und stattdessen eine Säule auf Kieselgelbasis eingesetzt. Die verwendete IC Säule Phenomenex[®] SAX (engl. *strong anion exchange*) kann nur bis zu einem pH-Wert von 8,0 betrieben werden. Ein höherer pH-Wert könnte sowieso nicht zur Analyse von Wein eingesetzt werden, da die Polyphenole und phenolische Säuren bei einem pH-Wert über 7 nicht stabil sind [169, 170]. Der Grund dafür ist die Deprotonierung der phenolischen Hydroxygruppe, was zur Oxidation führt. Trotzdem müssen die zu untersuchenden Analyten als Anionen vorliegen. Die im Wein vorkommenden phenolischen Säuren haben einen pK_S im Bereich von 2,9 bis 4,7 (Tabelle 14). Um diese Substanzen nahezu vollständig zu deprotonieren, wird ein um zwei Einheiten höher pH-Wert benötigt.

Tabelle 14: Eine Auswahl der phenolischen Komponenten im Weißwein [112] und ihre pK_s-Werte.

Verbindung	Konzentration [mg/L]	pK _s [171]
Gentisinsäure	0,15–1,07	2,95
Vanillinsäure	0,09–0,38	4,51
Ferulasäure	0,05–4,40	4,58
p-Cumarsäure	1,57–3,20	4,64
Kaffeesäure	1,50–5,20	4,62
Gallussäure	0,50–2,80	3,13

Aus diesen Gründen wurde ein Eluent mit dem pH-Wert von 6,5 eingesetzt. Dieser pH-Wert erfüllt alle notwendige Voraussetzungen. Er liegt ca. 2 pH-Einheiten unter dem pH-Wert für die Deprotonierung der Phenole und Polyphenole (pK_s des (+)-Catechins 8,7 [172]) und gleichzeitig ca. 2 Einheiten oberhalb des benötigten pH-Wertes für die Deprotonierung der phenolischen Säuren. Bei diesem pH-Wert ist die Stabilität der Säule ebenfalls gegeben.

Hydrogencarbonat als Standardeluent in der IC kann nicht eingesetzt werden. Zwar liegt der pK_s des Kohlensäure-Hydrogencarbonat-Gleichgewichts bei 6,35, jedoch stört das durch die Zersetzung der Kohlensäure entstehende Kohlendioxid den chromatographischen Trennprozess (Abbildung 28). Zudem liegt nur ein geringer Teil der Kohlensäure deprotoniert vor, wodurch die Elutionskraft des Eluenten herabgesetzt wird.

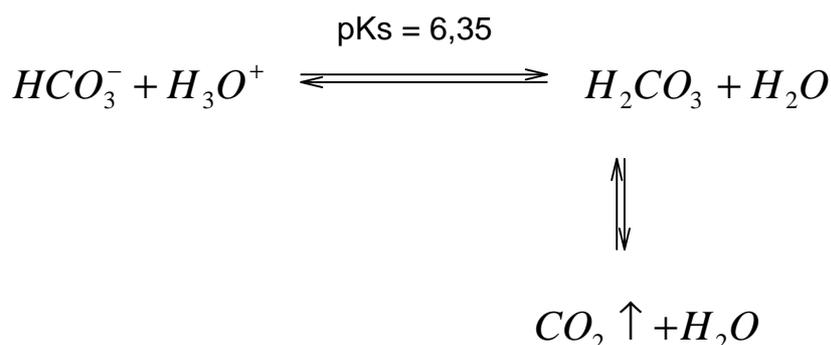


Abbildung 28: Kohlensäure-Hydrogencarbonat-Gleichgewicht

Anstelle von Hydrogencarbonat wurde Ammoniumformiat als Eluent verwendet. Die Pufferkapazität bei pH 6,5 ist allerdings nur sehr gering, da die pK_s-Werte von Ameisensäure (pK_s = 3,77) und Ammonium (pK_s = 9,21) weit von dem gewünschten pH-Wert entfernt liegen. Aus diesem Grund wurde die Probe bereits vor der Injektion auf pH 6,5 eingestellt. Der pH-Wert von Wein liegt zwischen 2,8 und 3,8 [112]. Die Erhöhung des pH-Wertes erfolgte mit Diammoniumcarbonat. An diese Stelle wurde die Pufferwirkung des

Kohlensäure-Hydrogencarbonat-Gleichgewichts ($pK_s = 6,35$) ausgenutzt. Das entstandene Kohlendioxid wurde mittels Ultraschall entfernt.

Nach der Trennung in der ersten Dimension erfolgte die Trennung auf einer Umkehrphase. Um eine gute Retention auf der RP18-Säule zu erzielen, sollten die Analyten ungeladen und möglichst unpolar sein. In der Regel wird bei der Analyse von organischen Säuren auf Umkehrphasen ein saurer Eluent eingesetzt, damit die Substanzen protoniert und ungeladen vorliegen. Um den Fokussierungseffekt nutzen zu können, wurden die Proben bereits vor der Injektion angesäuert. Dies wurde in dieser Arbeit durch die Zugaben von Ameisensäure zum Eluat der ersten Dimension sichergestellt. Die geringe Pufferkapazität des Eluenten der ersten Dimension ist an dieser Stelle wichtig und von Vorteil. Durch die Zugabe geringer Mengen an Ameisensäure konnte der pH-Wert auf ca. 2,5 eingestellt werden. Der verwendete Gradient in der ersten Dimension besteht zu Beginn der Trennung aus 12 mmol/L Ammoniumformiat und 1,3 % Methanol. Nach 60 min wurde die Zusammensetzung linear zu 91 mmol/L Ammoniumformiat und 9,1 % Methanol verändert. Alle folgenden Analysen wurden mit diesen Versuchsbedingungen durchgeführt.

In Abbildung 29 ist ein schematischer Aufbau des IC x LC-Systems dargestellt.

erste Dimension

zweite Dimension

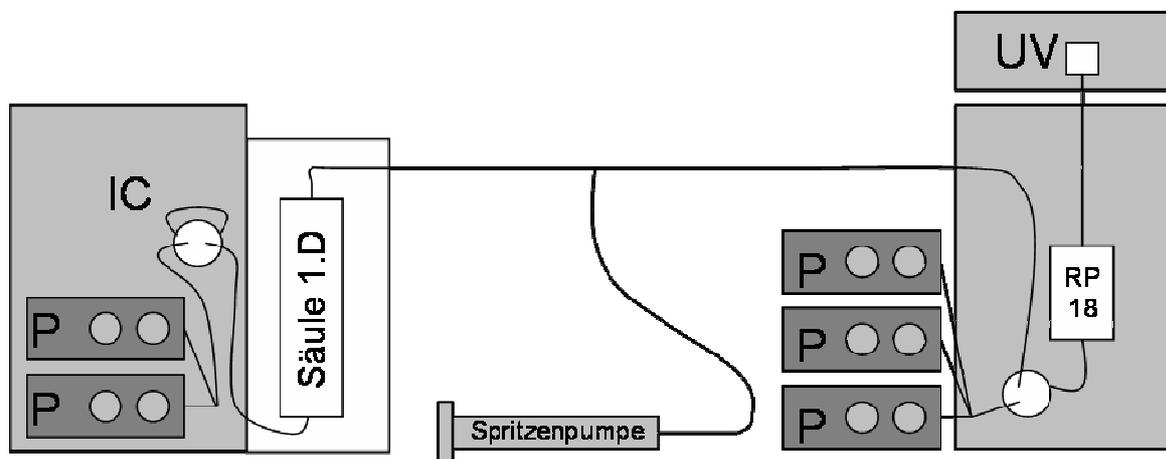


Abbildung 29: Schematische Darstellung der comprehensiven zweidimensionalen IC-LC x LC.

1. Dimension: Ionenchromatograph Metrohm 850 Professional IC mit Säulenofen (30 °C); Säulen: zwei Phenospher[®] SAX 150 x 2,0 mm (SAX) und / oder Kinetex[®] PFP 30 x 3,0 mm (PFP) von Phenomenex[®]. Modulationsschleifen: 100 µL. **2. Dimension:** Shimadzu Prominence 20 xr, mit Säulenofen (50 °C); Detektor: Shimadzu Prominence DAD SPD – M20A; UV-DAD 220-400 nm.

Die Trennleistung des Systems wurde unter Verwendung einer 14-Komponentenmischung abgeschätzt. Als Standardanalyten wurden (+)-Catechin, Nicotin-, L-Ascorbin-, Zitronen-, Weinsäure und neun weitere unterschiedliche Phenyl- und Benzoesäuren eingesetzt. In

Abbildung 30 ist ein zweidimensionales Chromatogramm dargestellt, bei dem die Detektion bei 254 nm erfolgte. Die Identifizierung der Substanzen wurde anhand der UV-Spektren durchgeführt. Die Säuren zeigen in der ersten Dimension eine gute Retention. Gleichzeitig ist auch die unterschiedliche Selektivität der beiden Dimensionen erkennbar.

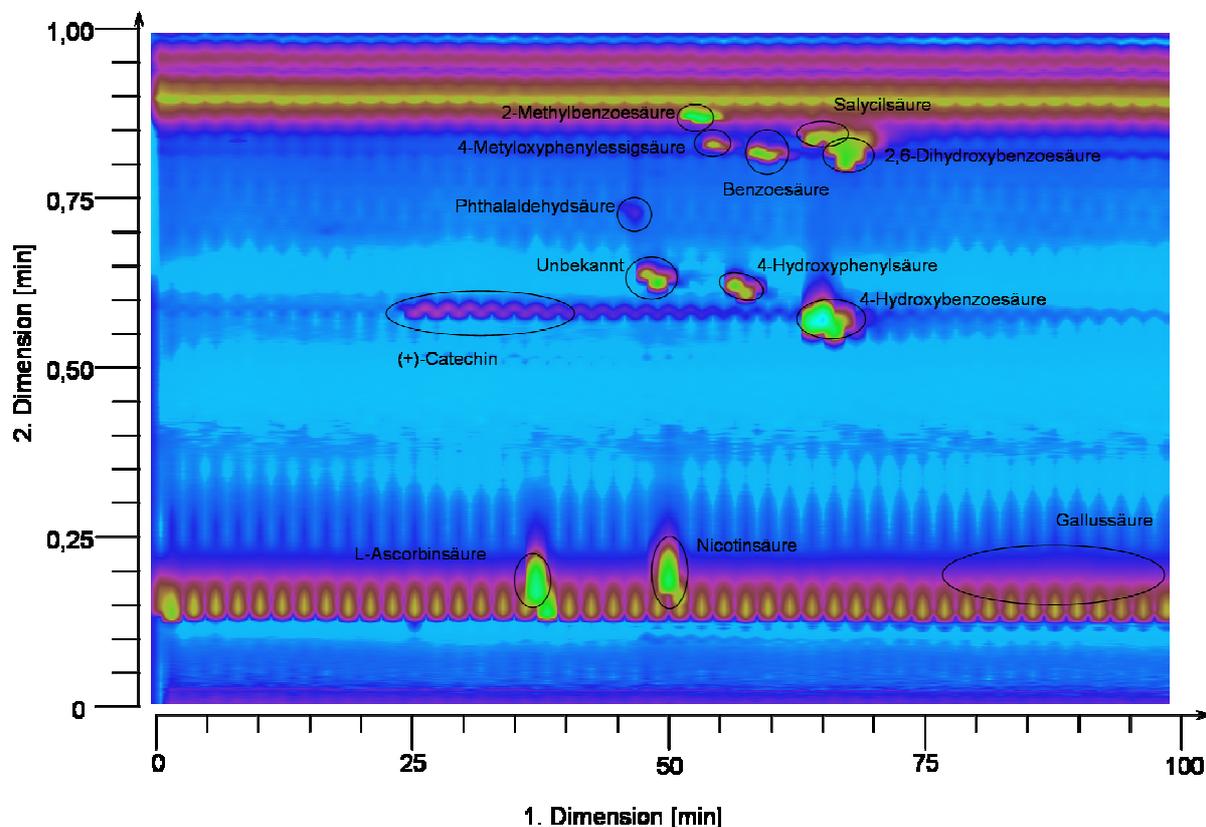


Abbildung 30: SAX-SAX x RP18 Analyse der 14-Komponenten-mischung. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.

1. Dimension: Ionenchromatograph Metrohm 850 Professional IC mit Säulenofen (30 °C); Gradient: von 12 mmol/L (NH₄)HCOO und 1,3 % MeOH zu 91 mmol/L (NH₄)HCOO und 9,1 % MeOH, pH 6,5; Fluss 0,09 mL/min; Säule: zwei Phenospher[®] SAX 150 x 2,0 mm (SAX) und / oder Kinetex[®] PFP 30 x 3,0 mm (PFP) von Phenomenex[®]; Modulation: Das Eluat der ersten Dimension wird mittels Spritzenpumpe mit Fluss 0,01 mL/min 2,6 mol/L HCOOH. Gesamtfluss: 0,1 mL/min, pH ca. 2,5; Modulationsschleifen: 100 µL. **2. Dimension:** Shimadzu Prominence 20 xr; Säulenofen (50 °C); linearer Gradient: MeOH / Wasser / HCOOH pH, ca. 2,5; Fluss: 2,25 mL/min; Säule: Kinetex[®] 2,6 µ XB-RP18, 50 mm x 3,0 mm 100A; Detektor: Shimadzu Prominence DAD SPD – M20A (220-400 nm)

Es konnten jedoch nicht alle Standards (Zitronen- und Weinsäure) aufgrund des Fehlens einer chromophoren Gruppe anhand der UV-Spektren identifiziert werden. Die starke Peakverbreiterung bei der Gallussäure führte zu einer geringen Signalintensität, weshalb diese Substanz nur bei 280 nm detektierbar war. Das ungeladene (+)-Catechin hat die geringste Retentionszeit auf der ersten Dimension und wie bei der Gallussäure, kommt es beim (+)-Catechin zu einem starken Tailing in der ersten Dimension.

Wie bereits beschrieben, eignet sich die Ionenchromatographie zur Trennung ionischer Analyten. Um mehr Substanzen im Wein analysieren zu können, wird ein weiterer

Trennmechanismus in der ersten Dimension benötigt. Deshalb wurde eine weitere Säule in der ersten Dimension hinter den SAX-Phasen positioniert.

In der Literatur wurde gezeigt, dass das Hintereinanderkoppeln einer IC-Säule mit einer zweiten IC-Säule [160] oder mit einer RP-Säule [162, 173] eine deutliche Steigerung der Trennleistung des Systems bewirken kann. So konnten Verbindungen aus unterschiedlichen Substanzenklassen in einer Analyse bestimmt werden. Das Eluat der ersten Säule wurde in seiner Zusammensetzung verändert und für die Trennung in der zweiten Säule angepasst [160, 173]. In diese Arbeit wurde in der ersten Dimension ebenfalls eine Kopplung der IC-Säule mit einer RP- Säule durchgeführt. Allerdings wurde der gleiche Eluent in beiden Säulen ohne Modifikation eingesetzt. Als zweite Säule für die erste Dimension diente eine PFP-Säule.

Um die Selektivitätsunterschiede der Säulenkombinationen SAX-SAX x RP18 und SAX-SAX-PFP x RP18 abschätzen zu können, wurde die gleiche 14-Komponentenmischung nur mit PFP in der ersten Dimension untersucht. In Abbildung 31 wird ein zweidimensionales Chromatogramm dieser Analyse gezeigt.

Die bei pH 6,5 vorliegenden Ionen haben auf der PFP-Phase eine geringe, die ungeladene phenolischen Verbindungen eine hohe Retention. Das ungeladene (+)-Catechin wird in der IC (Abbildung 30) nur wenig retardiert, auf der PFP (Abbildung 31) zeigt es dagegen die höchste Retention in der ersten Dimension. Die Retentionen der Säuren ändern sich ebenfalls drastisch.

Die Kopplung der beiden Säulenkombinationen (SAX-SAX-PFP x RP18) lieferte eine gute Trennung und wird im Folgenden als IC-LC x LC abgekürzt (Abbildung 32). Sowohl die Anionen der schwachen Säuren als auch die ungeladen Analyten zeigten mit dieser Methode ein gutes Retentionsverhalten. Das Tailing des (+)-Catechins und der Gallussäure in der ersten Dimension ist genau wie bei der Kopplung SAX-SAX x RP18 zu beobachten, jedoch beim (+)-Catechin weniger stark ausgeprägt. Die Retentionszeiten aller Standards auf den drei Säulenkombinationen befindet sich im Anhang (Tabelle 19).

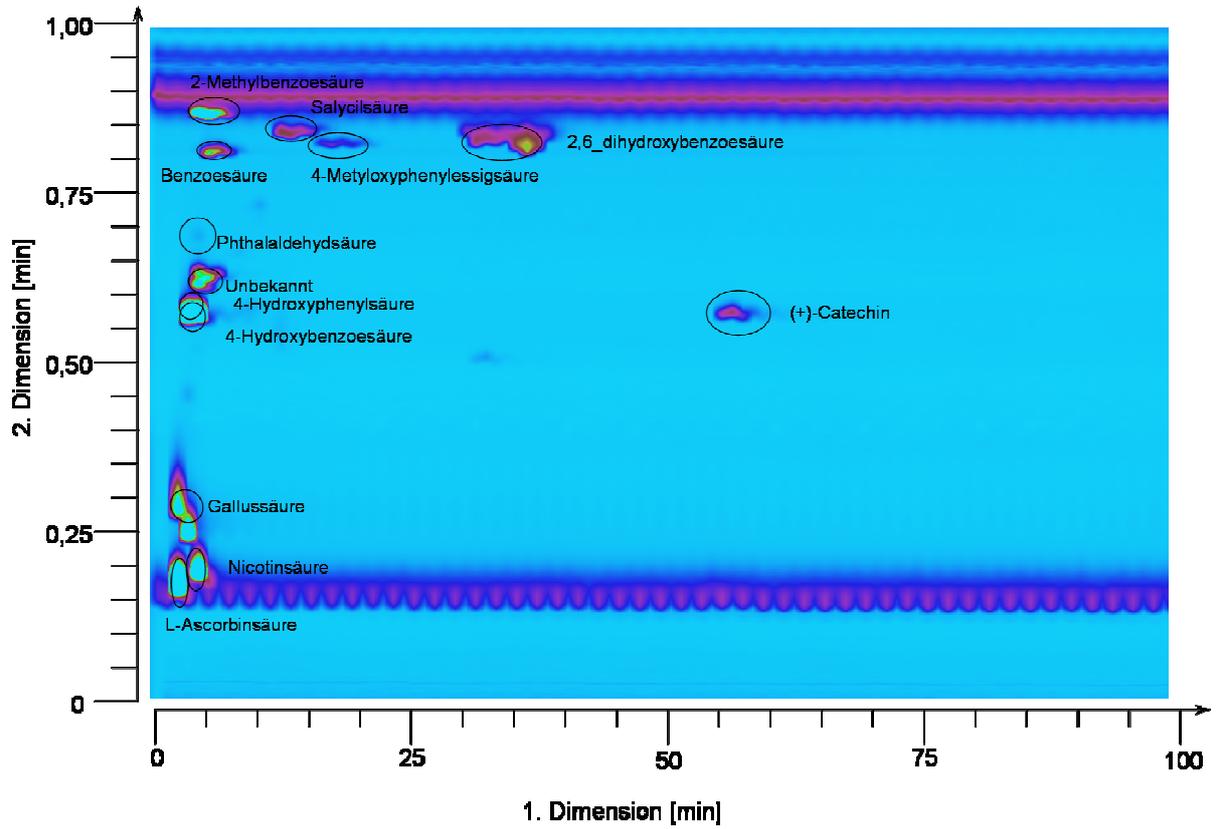


Abbildung 31: PFP x RP18-Analyse der 14-Komponentenmischung. Bedingungen sind analog zur Analyse in Abbildung 30.

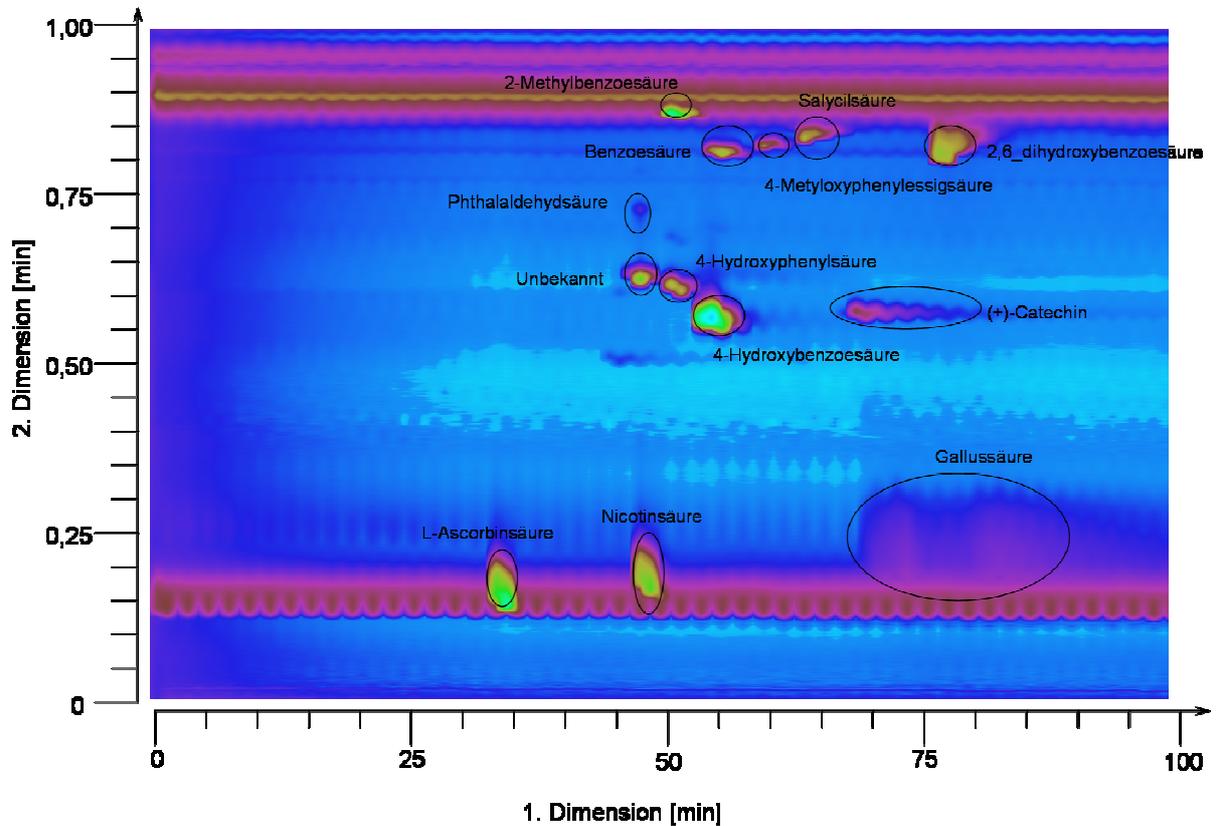


Abbildung 32: SAX-SAX-PFP x RP18-Analyse der 14-Komponentenmischung. Bedingungen sind analog zur Analyse in Abbildung 30.

4.3.1 Untersuchung von Wein

Die in Kapitel 4.3 vorgestellte Methode ermöglicht die Analyse von unpolaren und polaren Analyten sowie schwachen organischen Säuren in einem Analyselauf. Diese Voraussetzungen treffen auf die meisten im Wein enthaltenen Stoffe zu. Aus diesem Grund könnte die IC-LC x LC-Analyse von Wein wertvolle Hinweise über dessen Zusammensetzung liefern.

Untersucht wurde ein Weißwein (Riesling, feinherb 2011, Mosel, Thörnicher St. Michael) vom örtlichen Markt. Vom frisch geöffneten Wein wurden 10 mL entnommen und mit 0,75 mL einer 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ Lösung versetzt. Durch kurzes Eintauchen der Probe ins Ultraschallbad wurde das gebildete Kohlendioxid entfernt. Der pH-Wert der Probe betrug ca. 6,3. Nach Filtration der Probe durch ein 0,2 μm PTFE-Filter wurde der Wein mit der im vorherigen Kapitel beschriebenen Methode analysiert.

Auch mit der realen Probe wurden alle drei Säulenkombinationen getestet:

- SAX-SAX x RP18
- PFP x RP18
- SAX-SAX-PFP x RP18.

Um die Trennleistung der Methoden zu vergleichen, wurden die Peakkapazität und die Orthogonalität untereinander verglichen. Hierfür musste die Peakkapazitäten der ersten und der zweiten Dimension bestimmt werden. Die Peakbreiten der ersten Dimension wurden dafür mit Gleichung 23 berechnet. Der Mittelwert der Peakbreiten wurde jeweils aus sechs Spots bestimmt. Diese Spots sind in den Chromatogrammen eingekreist.

Aufgrund der Komplexität des Systems weisen die Peakbreiten in der ersten wie auch in der zweiten Dimension eine große Streuung auf. Die Komponenten mit geringer Retentionszeit in der zweiten Dimension (RP18) haben aufgrund einer schlechten Fokussierung Peakbreiten von 0,06 min (ca. 3,6 s). Bei den Substanzen mit höherer Retention beträgt die Peakbreite nur 0,022 min (ca. 1,3 s). Der Mittelwert der Peakbreiten von sechs Peaks mit unterschiedlicher Retentionszeit wurde zu 0,035 min (ca. 2,1 s) bestimmt. Da die effektive Analysenzeit in der zweiten Dimension 0,7 min (42 s) beträgt, ergibt sich daraus eine Peakkapazität von 20.

Die Analyse des Weins wurde zuerst nur mit den beiden SAX-Säulen oder einer PFP-Säule in der ersten Dimension durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Messungen waren nicht zufriedenstellend und in den Abbildung 33 und 35 dargestellt. Der Grund dafür wurde im vorherigen Kapitel anhand der Analyse einer Standardmischung diskutiert.

In Abbildung 33 ist die IC x LC-Analyse des Rieslings unter Verwendung von zwei SAX-Säulen ($L_{\text{ges}} = 30 \text{ cm}$) in der ersten Dimension gezeigt. Im Chromatogramm ist eine Vielzahl von Spots erkennbar. Die Korrelation der ersten zu der zweiten Dimension ist in dieser Analyse nicht leicht zu beschreiben. Es wird sowohl eine direkte als auch eine indirekte Korrelation beobachtet. Die Spots am unteren Rand des Chromatogramms stammen von aliphatischen mehrprotonigen Säuren wie Wein- (B), Äpfel- (C) und Zitronensäure (D) oder sehr polaren Säuren wie z.B. Ascorbinsäure (A) (Abbildung 30). Diese zeigen auf der RP18-Säule keine oder nur eine geringe Retention, was für die indirekte Korrelation spricht. Gleichzeitig ist auch eine schwach ausgeprägte direkte Korrelation zu beobachten. Diese Widersprüchlichkeit ist auf die vollkommen unterschiedliche Selektivität in der IC- und der RP-Chromatographie zurückzuführen. Da in der IC nur Ionen retardieren, eluieren die ungeladenen Analyten mit der Totzeit. Diese Stoffe werden zwar in der zweiten Dimension getrennt, allerdings ist die Trennung nicht ausreichend.

Abbildung 34 zeigt die Analyse des Rieslings mit der Säulenkombination PFP x RP18. Es wird eine typische Spotverteilung für eine direkte Korrelation beobachtet. Hierbei erfahren die unpolaren Analyten in der ersten und in der zweiten Dimension eine größere Retention als polare Analyten. Wie auch bei der Verwendung der Ionenchromatographie in der ersten Dimension, wurden zahlreiche Substanzen mit der Totzeit der ersten Dimension detektiert. In diesem Fall handelt es sich im Gegensatz zu der Kombination SAX-SAX x RP18 nicht um unpolare Substanzen, sondern um polaren und ionischen Analyten.

Abbildung 35 zeigt, dass die Kombination der beiden Techniken das beste Ergebnis lieferte. Vergleicht man jedoch alle drei Methoden untereinander, fällt auf, dass die beste Orthogonalität mit der Kombination SAX-SAX x RP18 (0,91) erzielt wurde (Tabelle 15). Die Peakkapazität, die mit dieser Kopplung erreicht wurde (456), ist zudem nur minimal schlechter als die mit der Kombination SAX-SAX-PFP x RP18 (497) erzielten.

Jedoch können erst durch den Einsatz der PFP-Säule die unpolaren Substanzen in der ersten Dimension getrennt werden. Der Vorteil dieser Säulenkombination wird auch durch die höhere Anzahl detektierbaren Verbindungen belegt. Die mit der Kombination PFP-RP18 erzielte Orthogonalität (0,61) stimmt gut mit der bei der Analyse des Extraktes von *Radix Angelicae sinensis* (0,60) überein. Bei der Analyse des Extraktes von *Radix Angelicae sinensis* wurden jedoch deutlich höhere Peakkapazitäten in der ersten Dimension (108) mit der PFP-Säule erzielt, als bei der Analyse von Wein (28). Der Grund dafür ist die sehr kurze PFP-Säule (3,0 x 30 mm) bei der Weinanalyse.

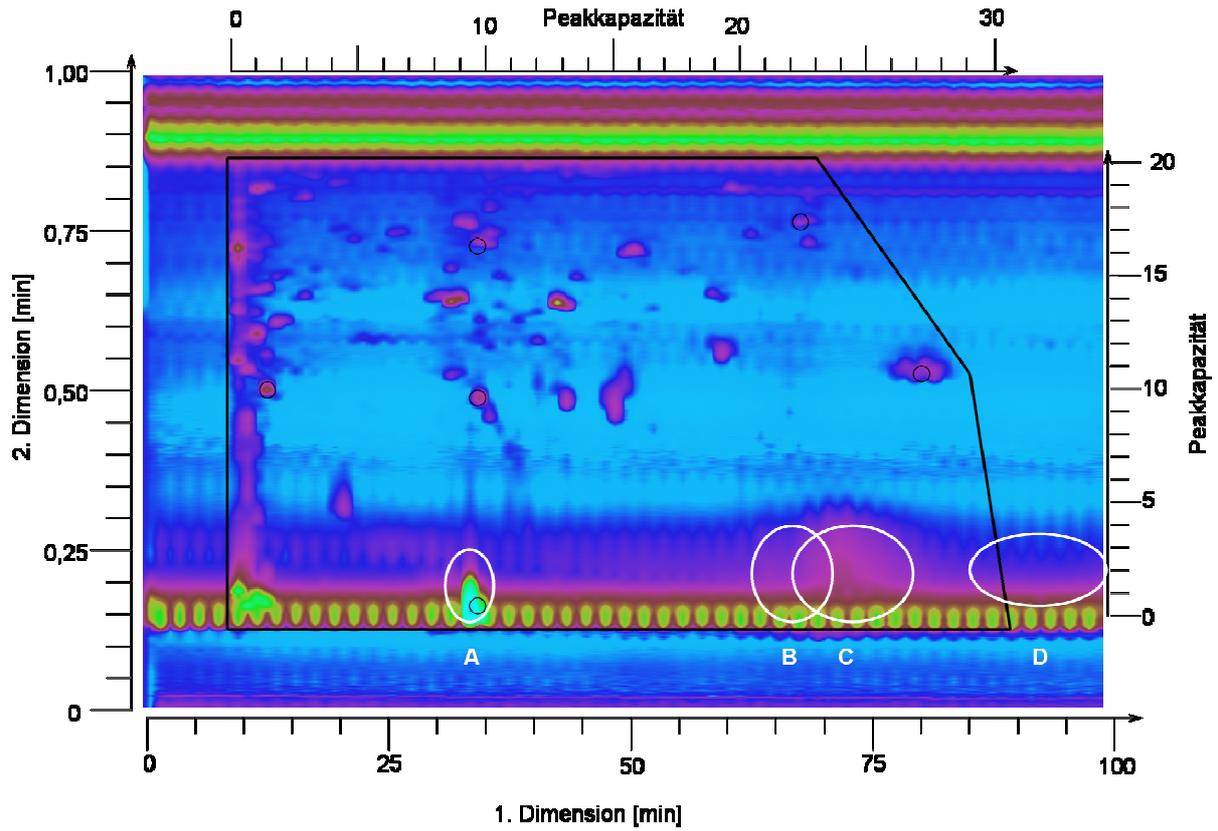


Abbildung 33: IC x LC-Analyse des Rieslings. Säulenkombination SAX-SAX x RP18. Methode ist analog zu der in Abbildung 30. A: Ascorbinsäure; B: Weinsäure; C: Äpfelsäure; D: Zitronensäure.

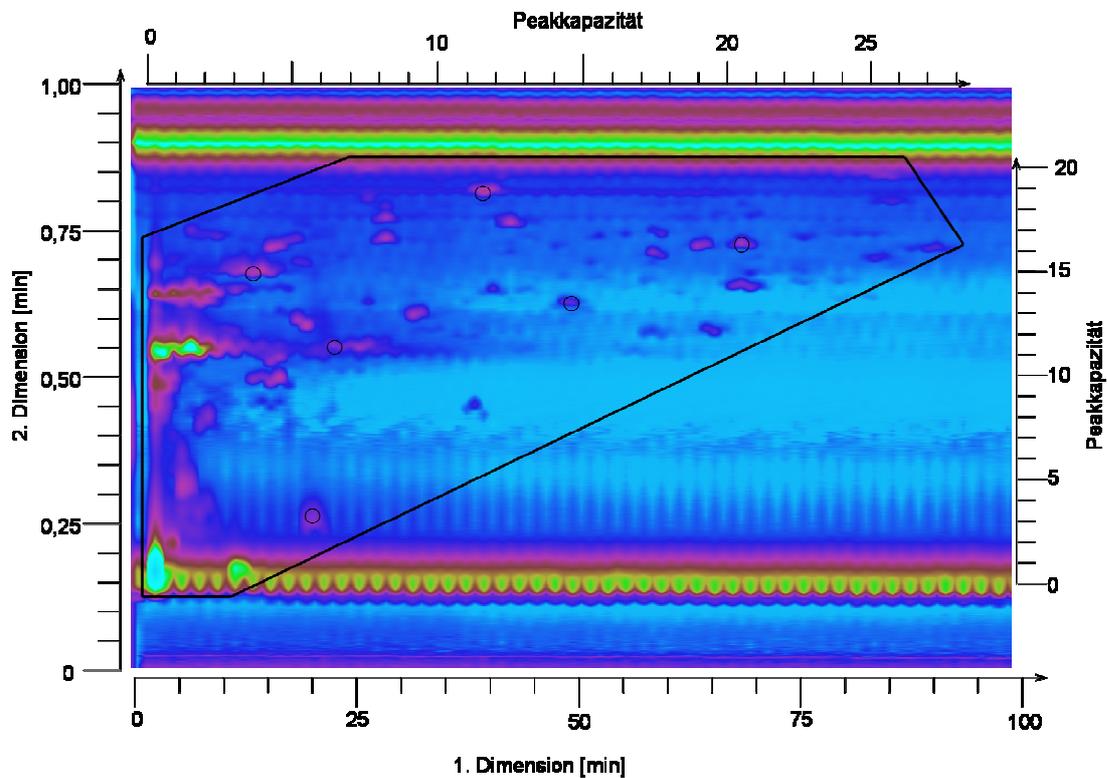


Abbildung 34: LC x LC-Analyse des Rieslings. Säulenkombination PFP x RP18. Methode ist analog zur in der Abbildung 30 gezeigten.

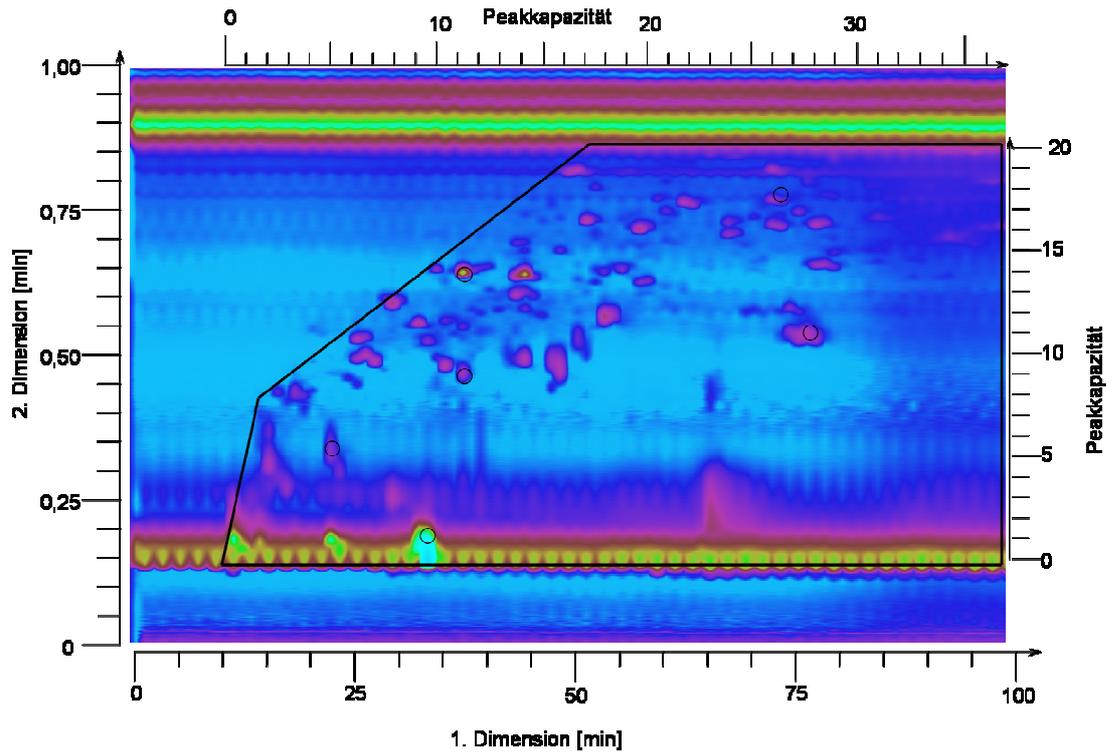


Abbildung 35: IC-LC x LC-Analyse des Rieslings. Säulenkombination SAX-SAX-PFP x RP 18. Methode ist analog zu der im Abbildung 30.

Die Orthogonalität der Kombination SAX-SAX-PFP x RP18 beträgt 0,86 und es ist auch eine direkte Korrelation zwischen den beiden Dimension zu erkennen. Eine Abweichung von der direkten Korrelation ist allerdings im unteren Abschnitt des Chromatogramms zu sehen. In diesem Bereich sind wie auch bei der SAX-SAX x RP18 Kombination polare Säuren anzutreffen.

Tabelle 15: Vergleich der drei comprehensiven zweidimensionalen Analysen von Wein.

erste Dimension			zweite Dimension (Kinetex® XB-RP18)						
Phase	Mittelwert	¹ n _{grd}	Mittelwert	² n _{grd}	A _{eff}	O	$\frac{1}{(\sigma^*)}$	^{2D} n	Anzahl Spots bei 254 nm
	w _b		w _b						
	[min]		[min]						
SAX-SAX	2,7	30	0,035	20	551	0,91	0,828	456	60
PFP	3,2	28			343	0,61	0,868	297	51
SAX-SAX-PFP	2,5	36			617	0,86	0,807	497	68

4.4 Entwicklung einer Moving Solvent Recycling-Chromatographie Methode

Um die aufgezeigten Nachteile der im Kapitel 2.1.4 vorgestellten Systeme zu beseitigen, wurde nach einer Alternative zur herkömmlichen Recycling-HPLC gesucht. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte neue Technik wurde MSR (engl. *moving solvent recycling chromatography*) genannt. Das Prinzip dieser Methode ist an die ER (engl. *external recycle chromatography*) [174] angelehnt. Bei der ER wird das Eluat nach der Trennung in Fraktionen gesammelt und zeitversetzt wieder auf die gleiche Säule injiziert.

In dieser Arbeit wurde bereits eine Fraktionierung und anschließende zeitversetzte nochmalige chromatographische Trennung als off-line LC x LC vorgestellt. Dabei handelt sich jedoch - anders als bei der ER - um eine Methode in der zwei unterschiedliche stationäre Phasen verwendet werden. Analog zur automatisierten on-line LC x LC wurde hier nach einer Automatisierungsmöglichkeit für die ER gesucht.

Das Kernstück eines LC x LC-Systems ist ein Modulator, der die erste und zweite Dimension verbindet [31]. Bei der hier entwickelten MSR wurden anstelle von zwei Säulen der Eingang und der Ausgang von ein und derselben Säule über den Modulator verbunden. Der Modulator in der LC x LC erfüllt somit in der MSR die gleiche Funktion: Das Sammeln der Fraktionen und das gleichzeitige Injizieren von diesen Fraktionen [151]. Der Unterschied zur LC x LC liegt dabei im Einsatz von nur einer Säule. Durch die Kombination der ER mit dem Modulator aus der LC x LC kann die Methode automatisiert werden. Der Modulator besteht im Wesentlichen aus einem Ventil und zwei Probeschleifen. Es wird das Eluat von der Säule in der ersten Probeschleife gesammelt, während der Inhalt der zweiten Probeschleife in die gleiche Säule injiziert wird.

4.4.1 Experimenteller Aufbau eines Moving Solvent Recycling-Chromatographie Systems

Abbildung 36 zeigt eine mögliche Kopplung auf Basis eines Zehn-Wege-Ventils. Bei dem Systemaufbau wurde die gleiche HPLC-Anlage verwendet wie bei den LC x LC-Anwendungen. Die durchgeführten Schaltungen sind der in der LC x LC ähnlich. Es sind auch andere Systeme denkbar, z.B. mit zwei Vier-Wege-Ventilen (nicht gezeigt) oder - wie in Abbildung 37 vorgestellt - eine Schaltung mit zwei Zehn-Wege-Ventilen. Der Recyclingprozess erfolgt bei einem Zehn-Wege-Ventil nach folgendem Schema (Abbildung 36):

Die grauen Flächen stellen Eluat mit Analyten, weiße Flächen frischen Eluenten dar.

A) Ausgangssituation: die Analyten befinden sich auf der Säule.

B) In der ersten Phase wird das Eluat in der Schleife gesammelt (Sammelzyklus Schleife b). Die Analyten treten aus der Säule raus: Schleife b wird mit Eluat geflutet.

C) Schleife b ist voll.

D) Ventil wird geschaltet.

E) Sammelzyklus Schleife a und Injektionszyklus Schleife b. Nach dem Schaltvorgang wird das gesammelte Eluat aus Schleife b durch frischen Eluenten in die Säule befördert (Injektionszyklus). In dieser Zeit wird Schleife a mit den Analyten gefüllt.

F) Sammelzyklus Schleife b und Injektionszyklus Schleife a. Nachdem Schleife a gefüllt ist, wird das Ventil erneut geschaltet und die Prozedur beginnt von vorne. Das Verbindungsstück Pass 4-9 kann als Verlängerung der Schleife a betrachtet werden.

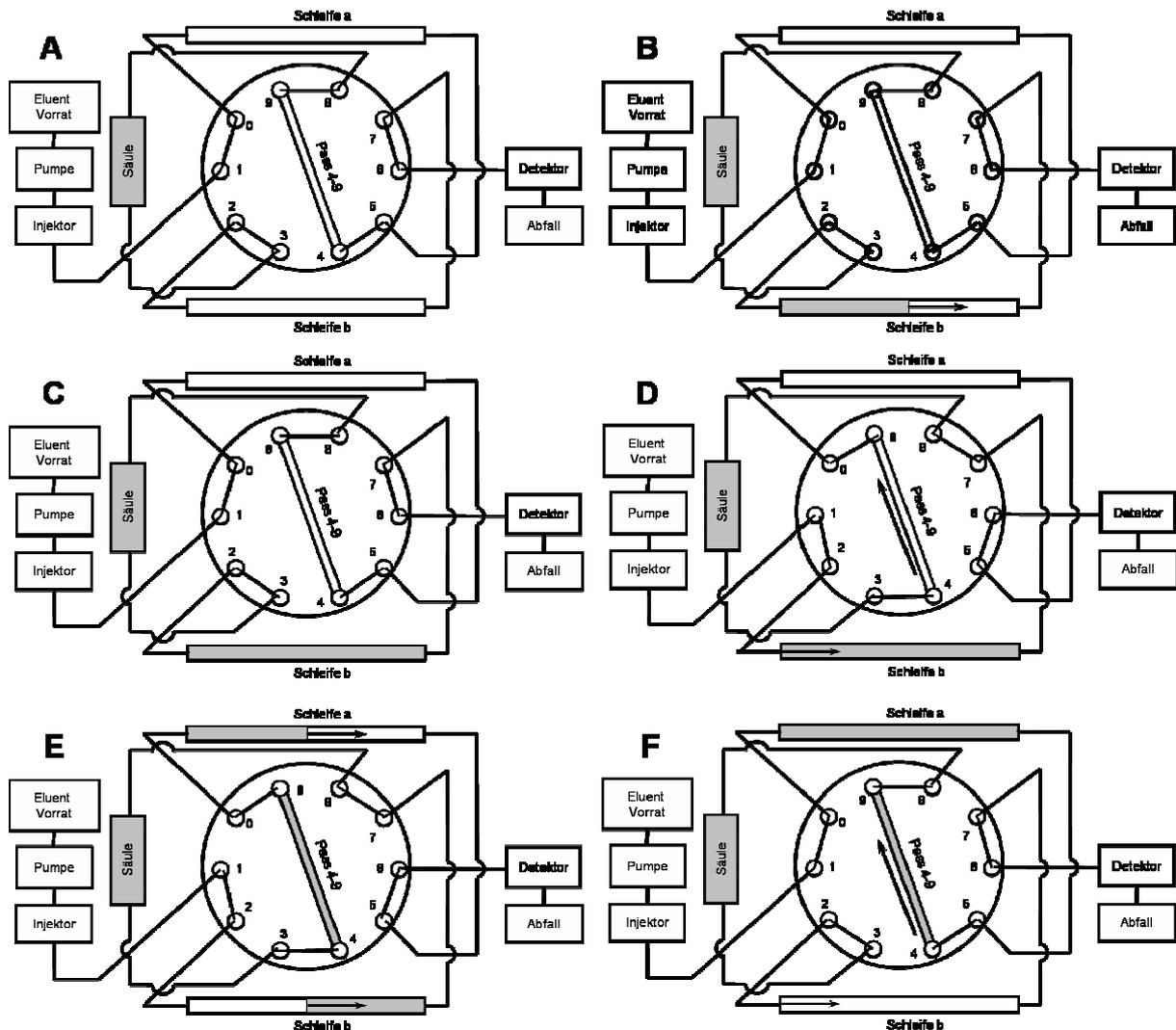


Abbildung 36: Schematische Darstellung der „Moving Solvent Recycling-HPLC“ mit einem Zehn-Wege-Ventil.

Die Zeitabstände der Schaltvorgänge müssen auf die Volumina der Sammelschleifen abgestimmt werden. Das geförderte Eluentvolumen muss in jedem Schaltvorgang dem Volumen der Sammelschleifen entsprechen. Nach dem nächsten Schaltvorgang wird erneut Eluat aus der Säule gesammelt indem der frische Eluent aus der Schleife verdrängt wird. Derselbe Vorgang, allerdings zeitversetzt, wird auch mit der zweiten Schleife durchgeführt. Solange zwischen den beiden Positionen geschaltet wird, erfolgt das Recycling. Ist die gewünschte Trennung erreicht, wird die Schaltung des Ventils gestoppt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Probe im Kreis geführt wird, ohne die Pumpe passieren zu müssen.

4.4.2 Studie zur nicht vollständigen Übertragung der Fraktionen bei der Moving Solvent Recycling-Chromatographie

Der größte Nachteil des MSR ist die nicht vollständige Übertragung der Fraktionen. Wenn der Fluss, die Modulationszeit und die Schleifengröße aufeinander abgestimmt sind, sollte kein frischer Eluent in den Kreislauf gelangen oder diesen verlassen. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass dies nicht der Fall ist.

Zur genaueren Betrachtung des Problems wurde mit folgendem Versuchsaufbau gearbeitet. Es wurde eine Schaltung mit zwei Zehn-Wege-Ventilen verwendet (Abbildung 37 A und B). Die Schaltung mit zwei Ventilen ist als exaktere Methode anzusehen.

Der Nachteil beim Einsatz nur eines Zehn-Wege-Ventils ist die Verbindung zwischen den Positionen vier und neun (Abbildung 36). Durch diese Verbindung verlängert sich die Schleife a. Durch die Reduzierung des Volumens von Verbindung 4-9 und Anpassung der Modulationszeiten oder der Schleifenlänge können die Auswirkungen dieses Verbindungsstücks allerdings soweit reduziert werden, dass sie vernachlässigbar sind. Für die folgende Untersuchung wurde dennoch eine Schaltung mit zwei Zehn-Wege-Ventilen eingesetzt, um auch diesen Effekt auszuschließen und das System so übersichtlich wie möglich zu gestalten.

Die Funktionsweise der MSR mit zwei Zehn-Wege-Ventilen ist mit dem in Abbildung 36 gezeigten System identisch. Statt einer Säule wurde eine Kapillare eingebaut und mit 1 %iger Ameisensäure geflutet. Die Ameisensäure dient zur Detektion von Flüssigkeitsverlust aus dem Kreislauf. Als Eluent wurde Wasser eingesetzt. Der Detektor wurde nicht im Kreislauf, sondern am Ende des Systems positioniert. Wenn Ameisensäure den Kreislauf verlässt, kann

diese mit einem UV-Detektor bei 225 nm detektiert werden. Die genaueren Versuchsbedingungen sind im experimentellen Teil beschrieben.

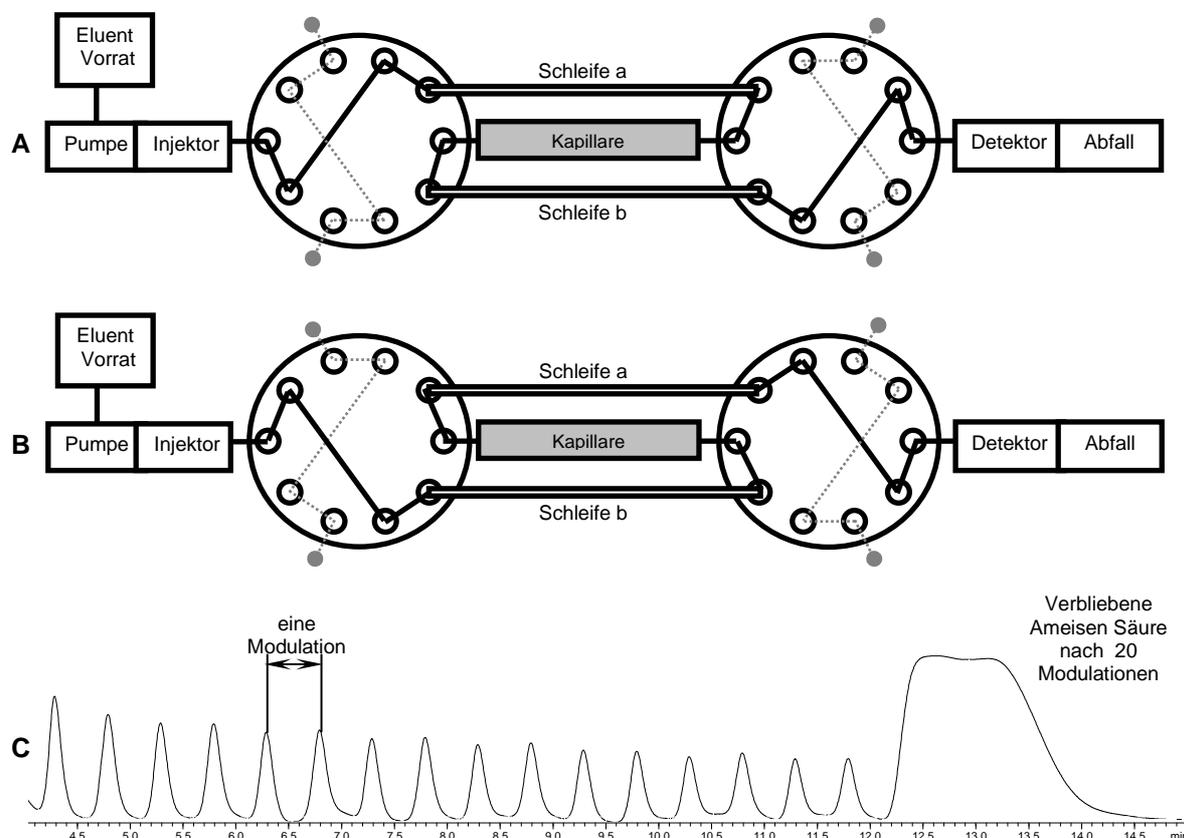


Abbildung 37: MSR-HPLC. A und B: Schaltung mit 2 Zehn-Wege-Ventilen. An Stelle einer Säule wurde eine Kapillare eingebaut und mit 1 % Ameisensäure geflutet. Als Eluent wurde Wasser eingesetzt. C: Chromatogramm der Recycling HPLC. Bei jeder Modulation verlässt ein Teil der Ameisensäure den Kreislauf (regelmäßig auftretende Peaks). Nachdem das Recycling gestoppt wurde, verlässt die restliche Ameisensäure das System.

In Abbildung 37 C ist ein Chromatogramm einer solchen MSR-Analyse dargestellt. Die regelmäßig auftretenden Peaks zeigen, dass mit jeder Modulation ein Teil der Ameisensäure den Kreislauf verlässt. Am Ende des Recyclingprozesses wird die verbliebene Ameisensäure mit dem Eluent aus dem System gespült (breiter Peak am Ende des Chromatogramms). Der Grund für das Austreten der Ameisensäure während des Recyclingprozesses ist die Durchmischung des Eluats mit dem frischen Eluent in den Kapillaren [13]. In den Sammelschleifen kommt es zur Ausbildung eines parabolischen Strömungsprofils an der Grenze zwischen frischem Eluent und dem Eluat aus der Säule. Dies führt zu einer nicht gewünschten Durchmischung in den Kapillaren (Kapitel 2.1.1). Die Grenze zwischen frischem Eluent und Eluat wird unscharf. Eine schematische Darstellung von diesem Sachverhalt ist in Abbildung 38 gezeigt. Bei den Schaltvorgängen erfolgt dagegen ein gerader

Schnitt. So wird ein Teil des Eluats aus dem Kreislauf ausgeschleust (mit Kreuzen markierte Flächen) und frischer Eluent dringt in den Kreislauf ein (mit Dreiecken markierte Flächen). Dies macht die Verwendung eines solchen Systems auf den ersten Blick sehr anfällig.

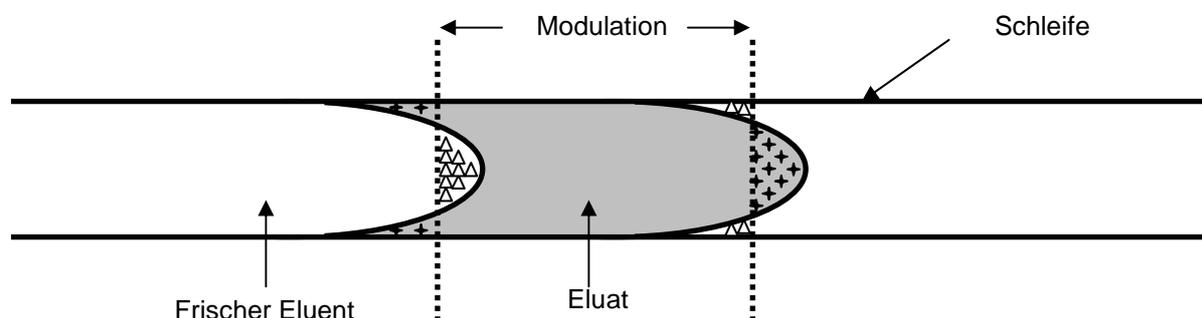


Abbildung 38: Schematische Darstellung des Eluats in der Sammelschleife mit Schaltvorgängen.

Der Verlust des Eluats aus den Sammelschleifen wird auch in der LC x LC beobachtet. Die vollständige Überführung der Fraktionen in die zweite Dimension kann dabei allerdings sichergestellt werden, indem die verwendeten Probeschleifen geringfügig größer sind als das Fraktionsvolumen [175]. Durch den deutlich größeren Fluss in der zweiten Dimension kommt es bei der LC x LC zur vollständigen Überführung der gesammelten Fraktion auf die zweite Säule. In der MSR ist dies nicht möglich. Die Verwendung von Probeschleifen, die größer sind als das Fraktionsvolumen, würde zu einer nicht vollständigen erneuten Injektion führen. Wie in Abbildung 38 ersichtlich ist, existiert keine scharfe Grenze zwischen frischem Eluent und Eluat. Dies zeigen auch die experimentell gewonnen Daten in Abbildung 39 mit Einsatz des in Abbildung 37 gezeigten Systems. Um den Verlust aus dem System in Abhängigkeit der Schleifenfüllung zu quantifizieren, wurde das Verhältnis der Peakfläche der austretenden Ameisensäure in der letzten Modulation zur verbliebenen Ameisensäure betrachtet. Dabei wurde die Zahl und die Dauer der Modulationen konstant gehalten. Nur der Fluss wurde variiert, um die Füllrate der Schleife zu ändern. Auch wenn der Fluss exakt auf das Volumen der Schleifen abgestimmt wurde (100 %), konnte es nicht verhindert werden, dass mehr als 3 % des Eluats verloren gingen. Der Verlust des Eluats variiert am Optimum aber nur gering. Selbst bei einer Abweichung der Schleifenfüllung um $\pm 5\%$ vom Optimum betrug der Verlust nur maximal 4 %.

Dieses Verhalten ist ähnlich mit dem von Seely in der LC x LC beschriebenen Phänomen „incomplete sampling of the first dimension“ [50]. Dabei wurde die Reproduzierbarkeit der Messungen in Abhängigkeit des Injektionsvolumens zum Sammelvolumen betrachtet [50].

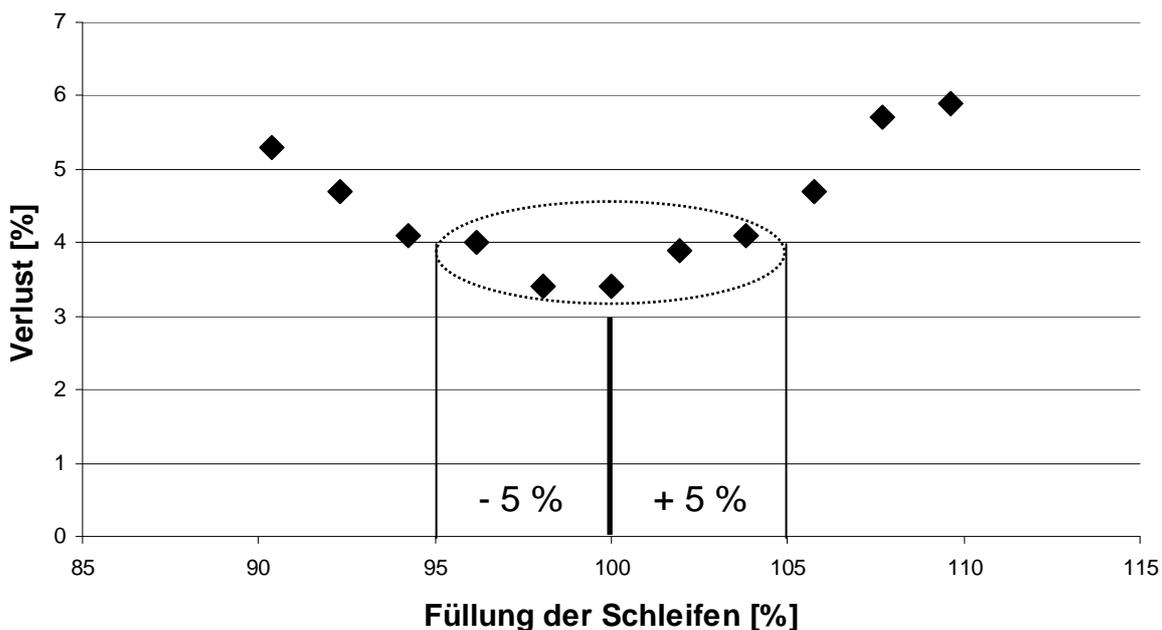


Abbildung 39: Verlust des Eluats aus dem Kreislauf in Abhängigkeit von der Füllrate der Probeschleifen. Temperatur: 50 °C, Schleifenvolumen: 130 µL, Modulationszeit 0,50 min, Fluss: 235 µL/min bis 285 µL/min.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde durch die Streuung eines Transferkoeffizienten bestimmt. Dieser Transferkoeffizient beschreibt die relative Übertragung der gesammelten Fraktion aus der ersten in die zweite Dimension und verändert sich je nachdem wie die Fraktionierung im Bezug zum Peak durchgeführt wurde. Laut Seely beträgt die Streuung des Transferkoeffizienten weniger als 0,1 % für alle mögliche Übertragungsraten, wenn die Modulationszeit der ersten Dimension höchstens das 1,5-fache der Standardabweichung der Peaks beträgt [50]. Dies ist in Übereinstimmung einer der Grundregel der LC x LC: mindestens 3 bis 4 Modulationen pro Peak der ersten Dimension [47]. Die Streuung sinkt rapide, wenn die Modulationszeit weiter verkürzt wird.

In der LC x LC ist die Modulationszeit dadurch bestimmt, dass in der 2. Dimension die komplette Trennung in dieser Zeit durchgeführt werden muss. Die Modulationszeit in der MSR ist im Gegensatz zur LC x LC nach unten kaum begrenzt. Es treten allerdings Probleme in der MSR bei sehr kleinen Schleifen auf:

- a) die Anpassung des Flusses auf die Modulationszeit und
- b) das Totvolumen der Ventile, die dann im Verhältnis zu den Schleifen einen größeren Beitrag zum Verlust des Analyten haben.

Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden mit Modulationszeiten von weniger als 1σ der Peaks und Übertragungsraten von ca. 0,9 (ca. 90 % des Fraktionsvolumens wird in die

Säule injiziert) durchgeführt. In diesem Fall beträgt die Streuung des Transferkoeffizienten deutlich weniger als 0,01 % und macht den Einsatz der MSR zur quantitativen Bestimmung möglich.

Einen wichtigen Unterschied zwischen LC x LC und MSR stellt die Wahl der Sammelschleifen dar. In der LC x LC ist nur das Volumen der Schleifen entscheidend. Bei der MSR sollten dagegen nicht nur Kapillaren mit möglichst kleinem Volumen, sondern auch mit kleinem Durchmesser verwendet werden. Wie aus Gleichung 10 (Kapitel 2.1.1) entnommen werden kann, ist in Kapillaren mit kleinerem Radius die Differenz zwischen den Geschwindigkeiten in der Mitte und am Rand der Kapillare geringer, was zu einer geringeren Durchmischung der Flüssigkeit (Hagen-Poiseuille-Strömungsprofil) in der Kapillare führt. Dadurch kommt es zu einem kleineren Verlust an Analyten bei der Modulation. Des Weiteren führt es zur Beibehaltung der Trennung während der Modulation. Im Vergleich zur LC x LC - bei der die erreichte Trennung in einer Fraktion verloren geht [31], bleibt die erzielte Trennung in der MSR erhalten.

Die Auswirkungen von geringerer Flussgeschwindigkeit und Viskosität sind in den Diagrammen in Abbildung 40 dargestellt. Dabei wurde anstelle einer Säule eine Kapillare eingesetzt. Als Maß für den Verlust aus dem System wird auch hier das Verhältnis der Peakfläche der austretenden Ameisensäure in der letzten Modulation zur verbliebenen Ameisensäure betrachtet. Durch die Erhöhung der Temperatur wird die Viskosität der Flüssigkeit abgesenkt, was zu einer weniger starken Ausbildung des parabolischen Strömungsprofils führt. Dadurch geht weniger Eluat verloren (Diagramm A).

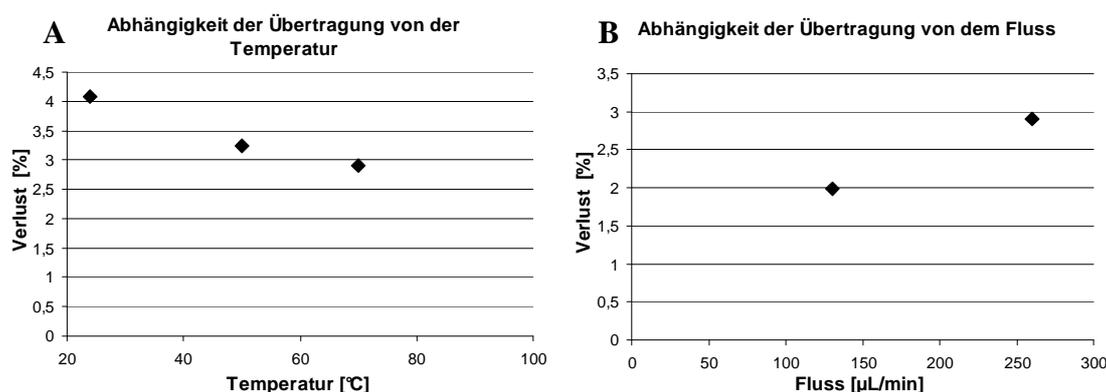


Abbildung 40: Verlust des Eluats aus dem Kreislauf in Abhängigkeit von der Temperatur bei einem Fluss von 250 µL/min (A) und dem Fluss bei 70 °C (B); Kapillare 35,5 µL; Volumen der Sammelschleifen 16,6 µL.

In Diagramm B ist der Verlust an Ameisensäure aus dem Kreislauf in Abhängigkeit vom Fluss gezeigt. Die Modulationszeit wurde an den Fluss angepasst, sodass pro Modulation die Schleifen vollständig geflutet wurden. Wie zu erwarten war, ist der Verlust bei niedriger Flussgeschwindigkeit auch geringer.

Beide Darstellungen zeigen, dass durch diese Faktoren die Übertragung beeinflusst werden kann. Ein verlustfreies Recycling ist jedoch nicht möglich. Schmalere Kapillaren, eine kleinere Flussgeschwindigkeit und eine geringere Viskosität reduzieren die Ausbildung des parabolischen Strömungsprofils. Aus diesem Grund wurden die Experimente bei relativ geringem Fluss, mit Acetonitril statt Methanol und bei 50 °C - der höchstzulässigen Temperatur für die verwendete Säule - durchgeführt.

Der Einsatz der MSR zu präparativen Zwecken ist aus oben gezeigtem Grund nicht sinnvoll. Für die analytischen Anwendungen eignet sich die MSR dagegen sehr gut. Die Vorteile der Methode werden im nachfolgenden Abschnitt gezeigt.

4.4.3 Vergleich unterschiedlicher Recycling-Methoden

In diesem Kapitel wird die am weitesten verbreitete CLR-Methode der neu entwickelten MSR-Methode gegenübergestellt. Der Vorteil der Recycling-Chromatographie und somit der CLR und MSR ist, dass eine längere Säule simuliert wird. Jedoch haben die unterschiedlichen Funktionsweisen der Methoden einen Einfluss auf die Peakverbreiterung, die außerhalb der Säule stattfindet. So werden im Folgenden die erzielten Bodenzahlen und Auflösungen verglichen.

Die Qualität der Trennung beider Systeme wurde anhand der Enantiomertrennung von R(-)-Carvon und S(+)-Carvon untersucht. Die Trennung erfolgte bei beiden Verfahren auf der gleichen β -Cyclodextrin-Phase und unter gleichen Versuchsbedingungen (Fluss, Eluent, Temperatur, Injektionsvolumen). Für beiden Methoden wurde auch das gleiche Zehn-Wege-Ventil - allerdings unterschiedlich geschaltet - eingesetzt (Abbildung 41).

In beiden Schaltvarianten wurde der Detektor nach der Säule in den Kreislauf eingebaut. Somit wurden die Analyten jedes Mal detektiert, wenn sie die Säule verließen. Das Recycling wurde für jede Methode sechs Mal durchgeführt. In Abbildung 42 sind die Chromatogramme der Trennungen gezeigt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Trennleistung der MSR besser ist, als die der CLR. Der Grund dafür ist die Peakverbreiterung durch den Pumpvorgang in der CLR.

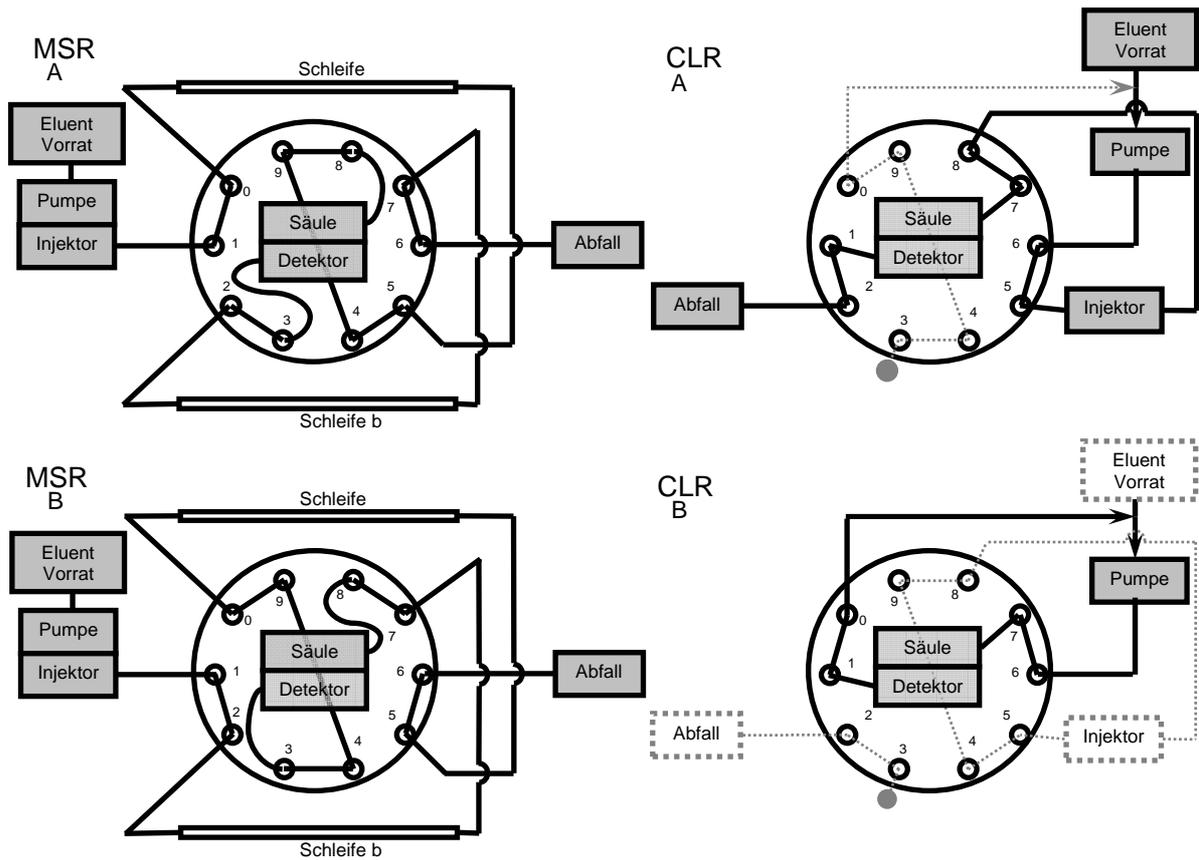


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Schaltung der MSR und CLR. Das Recycling bei der MSR erfolgt indem das Ventil zwischen den Positionen A und B in regelmäßigen Abständen geschaltet wird. Das Recycling bei der CLR wird nach der Injektion (Position A) durch das Schalten des Zehn-Wege-Ventils in Position B gestartet. Solange das Ventil in Position B ist, erfolgt Recycling. Durch das Schalten des Ventils zurück in Position A verlassen die Analyten das Recyclingsystem.

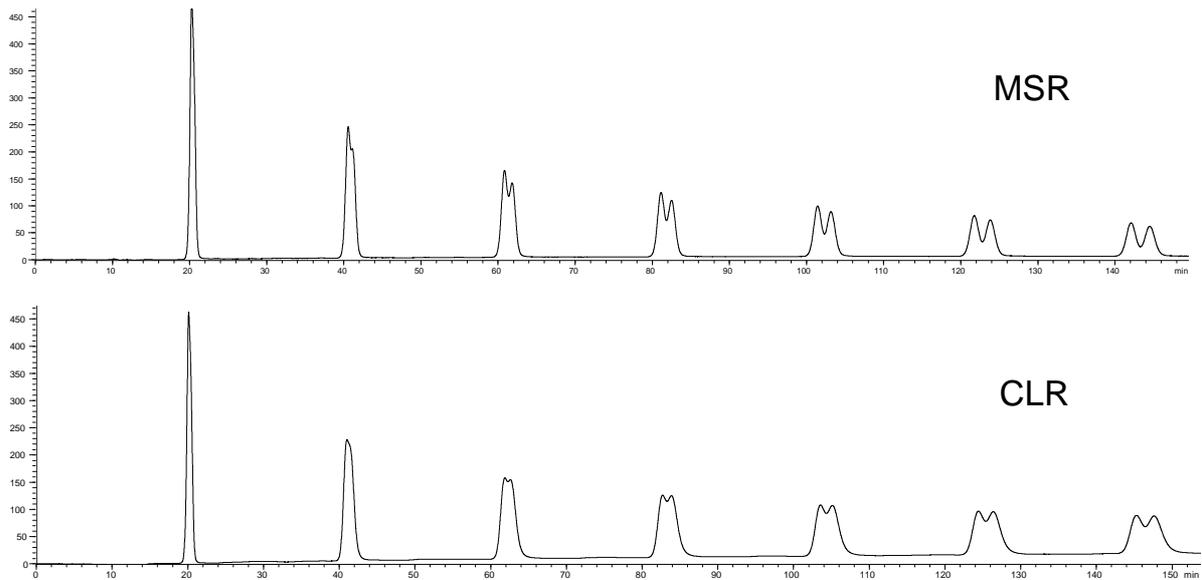


Abbildung 42: Chromatogramme zum Vergleich der Trennung mit MSR und CLR.

Eine quantitative Aussage der erzielten Trennleistung bietet der Vergleich der chromatographischen Kenngrößen. Hier wurden die Bodenzahl und die Auflösung der beiden Methoden miteinander verglichen. Die Bodenzahl wurde nach Gleichung 3 berechnet.

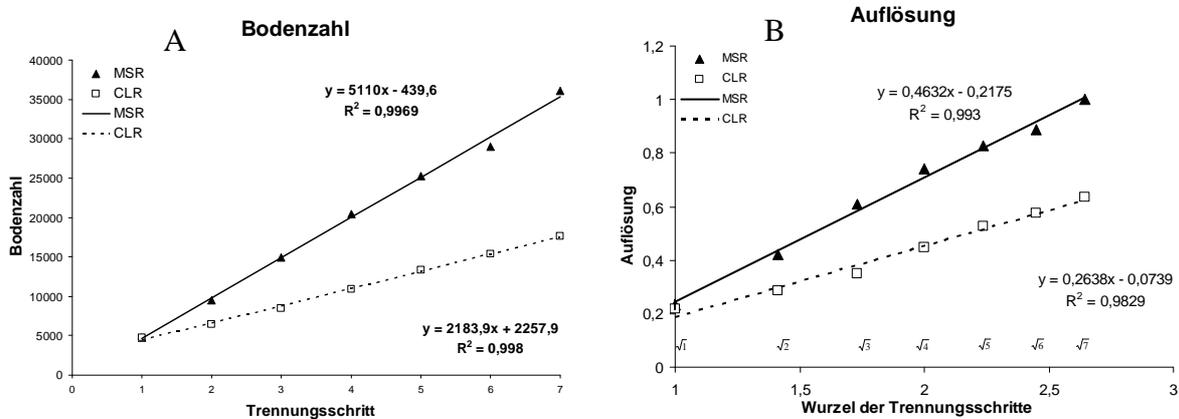


Abbildung 43: Vergleich der Trennleistung der Systeme MSR und CLR. A: Bodenzahl; B: Auflösung.

Die Bodenzahl für beide Systeme ohne Recycling liegt bei ca. 4500 Trennschritten. Mit jedem Recyclingschritt steigt die Bodenzahl für beide Systeme um den gleichen Betrag an. Der signifikante Unterschied besteht aber in der Steigung der Geraden. Bei MSR erhöht sich die Bodenzahl im Schnitt um 5110 Böden pro Trennungsschritt. Das bedeutet, dass die Peakverbreiterung während des Recyclingprozesses geringer ist als die Peakverbreiterung, die durch die Injektion verursacht wurde. Nach sieben Trennungsschritten wird so eine Bodenzahl von ca. 38000 erreicht.

Anders sieht es bei der CLR aus. Pro Trennungsschritt erhöht sich die Bodenzahl nur um 2184 und ist weniger als die Hälfte der Steigung bei der MSR und die Hälfte von der Bodenzahl, die bei der Analyse ohne Recycling erreicht wurde. Diese Tatsache weist auf starke Faktoren außerhalb der Säule hin, die erheblichen Einfluss auf die Peakverbreiterung haben. Wie schon oben angedeutet, ist der Grund dafür die Peakverbreiterung durch den Pumpvorgang. Nach sieben Trennungsschritten wird so eine Bodenzahl von nur ca. 17000 erreicht.

Die Änderung der Bodenzahl hat eine gravierende Auswirkung auf die erzielte Auflösung (Abbildung 43 B). Die Auflösung wurde nach Gleichung 5 berechnet und ist proportional zur Wurzel N (Gleichung 6) und somit zur Wurzel der simulierten Säulenlänge. Auch dieses kann im Diagramm bestätigt werden. Nach sieben Trennschritten wurde mit CLR nur eine Auflösung von ca. 0,6, bei MSR eine Auflösung von ca. 1,0 erreicht.

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Beurteilung der Systeme ist der Verlust der Analyten während des Recyclings. Bei dem Vergleich der Peakflächen ist festzustellen, dass die

Flächen der Analyten von Recyclingschritt zu Recyclingschritt geringer werden (Abbildung 44).

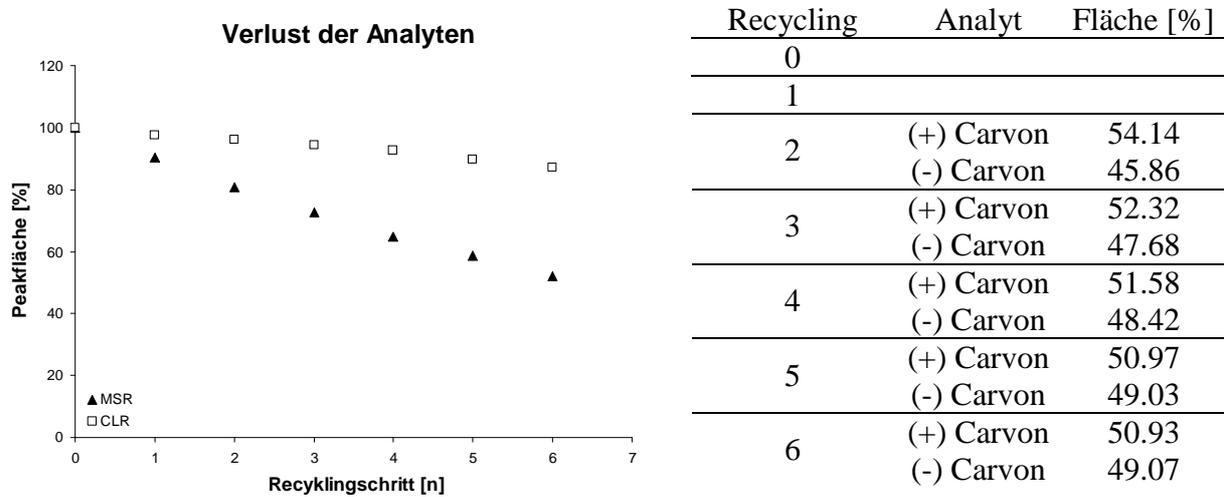


Abbildung 44: Links: Summe der Flächen beider Peaks. Rechts: Prozentuelle Zusammensetzung des Doppelpeaks nach jedem Recyclingschritt (Bestimmung der Fläche bei 240 nm) bei MSR.

Die Peakflächen der beiden Peaks verringern sich mit jedem Recyclingschritt. Nach der ersten Modulation beträgt die Peakfläche bei der MSR nur noch 90 %. Dieses Verhalten setzt sich mit jedem Recyclingschritt fort. Der Verlust von 10 % entspricht einer Übertragungsraten von 0,9 [50]. Die Erklärung für dieses Phänomen ist im Kapitel 4.4.2 beschrieben. Im gezeigten Fall beträgt die Sammelzeit weniger als eine Standardabweichung (ca. 0,7). Die Streuung des Transferkoeffizienten wird dadurch vernachlässigbar gering ($\ll 0,1\%$) [50].

In Abbildung 44 (rechts) ist die prozentuale Zusammensetzung des Doppelpeaks bei der MSR-Methode nach jedem Recyclingschritt (Bestimmung der Fläche bei 240 nm) dargestellt. Mit höherer Recyclingzahl wird eine bessere Trennung erzielt, sodass zuverlässigere Daten bei der Integration erhalten werden können. Ab dem fünften Recyclingschritt sind die Peakverhältnisse nahezu konstant. Die Restschwankung kann mit dem Integrationsfehler erklärt werden. Damit wurde das erwartete Verhalten bezüglich des konstanten Transferkoeffizienten bestätigt und die Reproduzierbarkeit des Systems gezeigt, wodurch ein Einsatz dieser Trenntechnik in der quantitativen Analytik ermöglicht wird.

Alle gezeigten Recycling-Systeme haben ihre Vor- und Nachteile. Eine Übersicht dazu ist in Tabelle 16 zusammengestellt. Aus den gezeigten Eigenschaften kann so ein geeignetes Verfahren für die jeweilige Fragestellung ausgewählt werden.

Tabelle 16: Vergleich der Recyclingverfahren in der Chromatographie.

Faktoren	Recyclingverfahren		
	MSR	CLR	AP [84]
Anzahl der Säulen	1	1	2
Druckkonstanz in der (den) Säule(n)	ja	ja	nein
Verwendung eines Standarddetektors (drucklabil)	ja	ja	nein
Verwendung von Pumpen mit großem Totvolumen	ja	nein	ja
Recycling ohne Peakverbreiterung in der Pumpe	ja	nein	ja
Verlustfreies Recycling	nein	ja	ja
Einsparmöglichkeit von Lösungsmittel	nein	ja	nein

Die Methoden CLR und MSR unterscheiden sich deutlich in ihren Eigenschaften. So ist der Einsatz der CLR in der präparativer Chromatographie sinnvoll. Durch die Verwendung der großvolumigen Säulen ist die Peakverbreiterung während des Pumpvorgangs weniger wichtig. Der Einsatz der MSR in der präparativer Chromatographie ist weniger sinnvoll. Der Verlust der Analyten bei dem chromatographischen Prozess ist ein Nachteil.

Da die MSR-Methode nur geringfügig zu einer Peakverbreiterung führt, kann hier eine deutlich höhere Trennleistungen erzielt werden. Das MSR kann somit hervorragend zur Analyse von Substanzen mit ähnlichen Retentionsfaktoren (z.B. Enantiomere) eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Säulenschaltungen bei der Flüssigchromatographie für unterschiedliche analytische Fragestellungen verwendet.

So wurde die comprehensive zweidimensionale Flüssigchromatographie zur Untersuchung von Tee eingesetzt. Dabei zeigte ein semiquantitativer Vergleich der Catechingehalte im Matcha- und Sencha-Tee, dass durch den Konsum von Match-Tee eine etwa doppelt so hohe Konzentration an Catechinen aufgenommen wird.

Zur Beurteilung der besten Säulenkombination in der LC x LC wurde ein auf Vektoren basierendes mathematisches Model entwickelt, mit dem die Berechnung der effektiven Fläche in einem zweidimensionalen Chromatogramm ermöglicht wird, unabhängig von der Komplexität der Spotverteilungen im Chromatogramm. Mit diesem Verfahren wurde die beste Säulenkombination zur Analyse von *Radix Angelicae sinensis* anhand der effektiven Fläche, der Peakkapazität und der Orthogonalität ermittelt. Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit der Säulenwahl, die durch den Neue-Test ermittelt wurde. Nicht nur die Selektivität der Phasen sondern auch die Eigenschaften der Analyten in der komplexen Probe bestimmen die beste Säulenwahl. Somit kommt für die optimale Säulenkombination die Beurteilung der Trennleistung – unmittelbar aus dem zweidimensionalen Chromatogramm – eine große Bedeutung zu.

Es wurde auch die Trennleistung einer on-line LC x LC mit einer off-line LC x LC anhand der Analyse von *Radix Angelicae sinensis* verglichen. Dabei zeigte, wie nicht anders erwartet, die off-line LC x LC-Methode eine höhere Peakkapazität (2683) als die on-line LC x LC (661). Dies ging jedoch mit einer deutlichen Steigerung der Analysenzeit von 5 auf 28 Stunden einher. Bei der Orthogonalität, dem Verbrauch an Lösungsmittel und der Qualität der MS-Spektren konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der große Vorteil der on-line Methode ist die höhere Anzahl der detektierten Substanzen, da es bei der off-line Methode wahrscheinlich zum Verlust der flüchtigen Analyten (ca. 30 %) während der Lagerung der Fraktionen kommt.

Zur Untersuchung von Weißwein wurde erstmals eine Kopplung der Ionenaustauschchromatographie mit der Umkehrphasenchromatographie (IC-LC x LC) angewandt. Diese Technik erlaubt die simultane Analyse von Phenolen, Polyphenolen, phenolischen Säuren und weiteren Komponenten im Wein. Im Vergleich mit bisher bekannten Methoden konnte mit dieser Methode eine hohe Orthogonalität erzielt werden.

Außerdem wurde durch die Verwendung von geeigneten Eluenten eine Kopplung des chromatographischen Systems mit einem Massenspektrometer ermöglicht.

Schließlich wurde in dieser Arbeit noch eine neue Recyclingmethode für die HPLC entwickelt, die zur Trennung von Substanzen mit ähnlichem Selektivitätsfaktor (z.B. Enantiomere) geeignet ist. Am Beispiel der Enantiomerentrennung von Carvon wurde u.a. der Vorteil dieser Methode – die geringe Peakverbreiterung während des Recyclingprozesses – im Vergleich mit der CLR-Methode gezeigt.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte

6.1.1 Flüssigchromatographische Systeme

UHPLC-System

Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D)

Kommunikationsmodul	Prominence Communications Module CBM – 20A
Degasser	Prominence Degasser DGU – 10AS
drei HPLC – Pumpen	Prominence LC – 20AD xr
Autosampler	Prominence Autosampler SIL – 20 ^a XR
Säulenofen	Prominence Column Oven CTO – 20A
Detektor	Prominence DAD SPD – M20A
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24

HPLC-System

Alliance 2690 Separations Module, Waters Corporation, Milford (USA)

System	Alliance 2690 Separations Module
Steuerungs- und Auswertesoftware	MassLynx 4.0, Waters Corporation, Millford (USA)

IC-System

Metrohm 850 Professional IC, Metrohm AG, Herisau (CH)

System	AnCat – MCM-HC – MCS – 2.850.3040
Steuerungs- und Auswertesoftware	MagIC Net TM

6.1.2 Massenspektrometer

Massenspektrometer Micromass	Massenspektrometer Micromass Q-Tof Ultima™ API, Waters Corporation, Millford (USA)
Stickstoffgenerator	Nitrogen Generator, PEAK SCIENTIFIF, Inchinnan (UK)
Steuerungs- und Auswertesoftware	MassLynx 4.0, Waters Corporation, Millford (USA)

6.1.3 Sonstige Geräte

Zentrifuge	Mini-Spin-Tischzentrifuge [max.13400 rpm/min], Eppendorf Hamburg (D)
Thermomixer und Zubehör	Thermomixer comfort incl. 2 mL Aufsatz, Eppendorf Hamburg (D)
Speed Vac Jouan	RC 1022, Jouan, Saint Herblain (F)
Kryostat	RCT 90 Jouan Saint Herblain (F)
Drehschieberpumpe	Pascal 2005 SD Alcatel Vacuum Technology Annecy Cedex (F)
Ölabscheider	OME 25 S Alcatel Vacuum Technology Annecy Cedex (F)
Wasseraufbereitungsanlage	TKA 08.2207 Niederejbert (D) Reinheit von 18,18 MΩ / cm, TOC <5 ppb
Feinwaage BP 221S	d = 0,1mg Sartorius, Göttingen (D)
Analysenwaage EMB 600-2	d = 10 mg Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern (D)
Transferpipetten®	[100 – 1000 µL, 10 – 100 µL, 1 – 10 µL Brand, Wertheim (D)
pH-Meter	Beckman φ 350, Beckman Coulter, Krefeld (D)
pH-Standardelektrode	511052, Beckman Coulter, Krefeld (D)
Gefrierschrank	Liebherr Comfort G 2771, Liebherr, Ochsenhausen (D)
Kühlschrank	Liebherr Premium K 2650, Liebherr, Ochsenhausen (D)
Ultraschallbad	Merck eurolab USR 54 H, Merck eurolab Bruchsal (D)
Trockenschrank	T 6 [1,22] Heraeus, Hanau (D)
Spritzenpumpe <i>Plus 11</i>	Harvard Apparatus, Holliston, (USA)
Switchos II	Advanced Microcolumn Switching Unit, LC Packings (NL)

6.1.4 Software

Textverarbeitung	MS-Word 2002
Tabellenkalkulation	MS-Excel 2002
Präsentation	MS-PowerPoint 2002
Grafikgestaltung	ACD/ChemSketch 12.01
Zweidimensionale Auswertesoftware	GC Image v. 1.9b5 LCxLC-MS_3_5_1 auf Basis von Labview

6.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Standards für den Neue-Test

Uracil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
Naphthalen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
Acenaphthen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
Propranolol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
Amitriptylin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
Butylparaben	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
Dipropylphthalat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)

Die eingesetzten Standards bei der Kopplung von Ionenchromatographie mit Umkehrphasenchromatographie

Nicotinsäure	Fluka [®] AG Buchs (CH)
Benzoessäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
Phthalaldehydsäure	Merck-Schuchard OHG Hohenbrunn (D)
4-Hydrophenylsäure	Merck-Schuchard OHG Hohenbrunn (D)
4-Hydroxybenzoessäure	Fluka [®] AG Buchs (CH)
2-Methylbenzoessäure	Bayer AG Leverkusen (D)
2,6-Dihydroxybenzoessäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
4-Metyloxyphenylelessigsäure	Fluka [®] AG Buchs (CH)
Gallussäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
L-Ascorbinsäure (Natrium-Salz)	Acros organics Geel (B)
Salicylsäure (Natrium-Salz)	Bayer AG Leverkusen (D)
(+)-Catechin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
Zitronensäure	Merck-Schuchard OHG Hohenbrunn (D)
Weinsäure (Di Natrium Salz)	Merck-Schuchard OHG Hohenbrunn (D)

Experimenteller Teil

Eluent

Acetonitril	HiPerSolv Chromanorm for HPLC LC-MS grade, VWR Leuven (B) Fisher Scientific GmbH, HPLC-Grade, Schwerte (D)
Methanol	HPLC grade Fisher Loughborough (UK) Acros Organics für HPLC, New Jersey (USA) HiPerSolv Chromanorm Fontenau-sous-Bois (F)

Sonstige Chemikalien

NH ₄ HCO ₃	Fluka [®] AG Buchs (CH)
(NH ₄) ₂ CO ₃	Fluka [®] AG Buchs (CH)
Universalindikator pH 1-14	Merck-Schuchard OHG Hohenbrunn (D)
Uracil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
Coffein	Fluka [®] AG Buchs (CH)
K ₂ HPO ₄	Merck KGaA Darmstadt (D)
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA Darmstadt (D)
Ameisensäure	Fluka [®] AG Buchs (CH)
R(-)-Carvon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)
S(+)-Carvon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim (D)

Experimenteller Teil

Verbrauchsmaterial	
HPLC/GC-Vial	Vials WE 9408, Flasche G1, klar, CS-Chromatographie Servia GmbH, Langerwehe (D)
Schraubdeckel für HPLC/GC-Vial	Schraubkappe G8-L WE 9186, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe (D)
Dichtscheibe für HPLC/GC-Vial	Dichtscheibe G8 WE 11078, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe (D) und Dichtscheibe G8-Sil, WE 10969, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe (D)
Mikroeingang	ME G27 mit Rand, CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe (D)
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen 200 µL, gelb, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D) Pipettenspitzen 1250 µL, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D) Plastikbrand 5 mL, BRAND GmbH & Co KG, Wertheim (D)
Eppendorf-Cups	Safe-Lock Tubes, 1,5 mL, Eppendorf AG, Hamburg (D) Safe-Lock Tubes, 2 mL, Eppendorf AG, Hamburg (D)
Einmalspritze	2 mL, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Spritzennadel	Spritzennadel, Sterican, Braun, Melsungen (D) Einmalspritze Einmalspritze, 1 mL, Omnifix® - F, Braun, Melsungen (D)
Spritzenvorsatzfilter	PTFE, 0,2 µm, CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe (D)

6.3 Methoden

6.3.1 Aufbau eines on-line komprehensiven zweidimensionalen HPLC Systems

Vergleich der Säulen für die zweite Dimension

Verwendete Säulen

	Dimensionen	Partikel	Hersteller
Kinetex [®] RP 18	3 mm x 30 mm	2,6 µm	Phenomenex
Kinetex [®] RP 18	3 mm x 50 mm	2,6 µm	Phenomenex
Kinetex [®] RP 18	4,6 mm x 30 mm	2,6 µm	Phenomenex
Halo [®] RP 18	3 mm x 30 mm	2,7 µm	Advanced Materials Technology
Chromolith [®] RP 18	3 mm x 30 mm	monolithische Säure	Merck

Methode 1: Versuchsbedingungen. Vergleich der Säulen für die zweite Dimension.

Injektion	25 µL			
Probe	Uracil 10 mg/L, Coffein 10 mg/L in Wasser			
System	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D)			
Fluss	2,25 mL/min oder 3,00 mL/min			
Temperatur	50 °C			
Analysenzeit	Injektion nach eine Minute Vorlauf. Gradientzeit 1 min oder 2 min			
Linearer Gradient	Zeit	H ₂ O	MeOH	1 % HCOOH
	[min]	[%]	[%]	[%]
	Start	85	5	10
	Ende	60	30	10
Detektor	Shimadzu Prominence DAD SPD – M20A			
Detektoreinstellungen	UV 220-400 nm Sampling 40 Hz Time constant 0,025 Temperatur 50 °C			
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24			

Durchführung des Neue-Tests

Verwendete Säulen

Bezeichnung	Dimensionen	Fluss	Hersteller
Kinetex [®] PFP	2,1 mm x 150 mm 1,7 µm	0,1 mL/min	Phenomenex [®]
Luna [®] CN	2,0 mm x 150 mm 3,0 µm	0,25 mL/min	Phenomenex [®]
MN CN	2,1 mm x 250 mm 3 µm	0,25 mL/min	Macherey Nagel
Kinetex [®] RP 18	3 mm x 50 mm 2,6 µm	0,6 mL/min	Phenomenex [®]

Methode 2: Versuchsbedingungen Neue-Test [68].

Injektion	1 µL, Probe
Probe	Uracil 1,7 mg/L, Naphthalen 2,5 mg/L, Acenaphthen 17 mg/L, Propranolol 37 mg/L, Amitriptylin 23 mg/L, Dipropylphthalat 40 mg/L, Butylparaben 1,8 mg/L, in Wasser
System	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D)
Temperatur	30 °C
Isokratisch	35 % (20 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,00 in Wasser) 65 % Methanol
Detektor	Shimadzu Prominence DAD SPD – M20A
Detektoreinstellungen	UV 220-400 nm Sampling 40 Hz Time constant 0,025 Temperatur 50 °C
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24

Untersuchung von Tee

Probenvorbereitung

Matcha-Tee

Der verwendete Matcha-Tee ist ein grüner Tee (Green Tea No. 726) von Tee Gschwender (Wuppertal, Deutschland). Zunächst wurden ca. 0,5 g Matcha-Tee in 10 mL 10 %iger Methanollösung suspendiert. Anschließend wurde die Probe ca. 15 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Probe wurde zweimal je 2 min bei ca. 13000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, abdekantiert und durch 0,2 µm PTFE Filter filtriert. Bei der LC x LC-Analysen wurde die Probe ohne weitere Aufbereitung eingesetzt.

Sencha-Tee

Bei dem verwendeten Sencha-Tee handelt es sich ebenfalls um einen Tee der Firma Tee-Gschwender (Japan Sencha Extra Fine, Probierportion, Nr. 705). Es wurden ca. 1,1 g Sencha-Tee in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 20 mL 70 °C warmen, entionisierten Wasser versetzt. Nach 2 min wurde der Extrakt in 1,5 mL-Eppendorf-Cups gegeben und zweimal je 2 min bei ca. 13000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) filtriert und 9 mL des Filtrats wurden mit 1 mL 10 %iger Methanollösung versetzt. Nachdem die Probenlösung gut durchmischt war, wurden ca. 1 mL in ein Proben-Vial überführt.

Verwendete Säulen:

Säule erste Dimension	ProntoSIL 100-5-CN 2 (3.0 mm x 190 mm, 5 µm) Bischoff, Leonberg (D)
Säule zweite Dimension	Halo C18 (4.6 mm x 30 mm, 2.7 µm), Advanced Materials Technology (USA)

Experimenteller Teil

Methode 3: LC x LC-Analyse von Matcha- und Sencha-Tee.

Injektion	10 µL, Probe			
Erste Dimension	HPLC-System Alliance 2690 Separations Module, Waters Corporation, Milford (USA)			
Fluss	0,050 mL/min			
Temperatur	50 °C			
Linearer Gradient	Zeit	Wasser	Methanol	1 % Ameisensäure
	[min]	[%]	[%]	[%]
	0	60	0	40
	40	60	0	40
	240	30	30	40
	300	20	40	40
Modulation	10 Wege-ventil, Rheodyne IDEX Health & Science Wertheim-Mondfeld (D)			
Modulationszeit	2,00 min			
Schleifen	100 µL			
Zweite Dimension	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (Germany)			
Fluss	3,00 mL/min			
Temperatur	50 °C			
Linearer Gradient	Zeit	Wasser	Methanol	1 % Ameisensäure
	[min]	[%]	[%]	[%]
	1,03	55	5	40
	2,25	10	50	40
	2,35	0	60	40
	2,45	0	60	40
	2,50	20	40	40
	2,80	55	5	40
	3,01	55	5	40
Detektor 1	Shimadzu Prominence DAD SPD - M20A			
Detektoreinstellungen	UV 220-400 nm Sampling 40 Hz Time constant 0,625 Temperatur 50 °C			
Detektor 2	Massenspektrometer Micromass Q-Tof Ultima™ API			
Detektoreinstellungen	Fluss reduziert auf ca. 150 µl/min ESI - 100 – 1000 u Capillary 1,9 kV			
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24 MassLynx 4.0, Waters Corporation, Millford (USA)			
Auswertesoftware	GC Image v. 1.9b5			

Experimenteller Teil

Methode 4: LC x LC-Analyse von Matcha- und Sencha-Tee. MS-Einstellungen, Bestimmung der Präzisionsmassen.

Massenspektrometer Micromass Q-ToF UltimaTM API

Messmodus ESI-,	W-Modus
Split	1:20
Massenbereich	100-1000 Da
Kapillarspannung	1,9 kV
Temperatur der Ionenquelle	120 °C
Desolvatationstemperatur	180 °C
TOF-Spannung	10,5 kV
Reflectron	28,00 kV
Pusherzyklus	35 µs
MCP-Spannung	2100 V
Collisionsenergie	2 V
Referenz	Phosphorsäure
Switchlock	4 s / 1 s

Methode 5: LC x LC Analyse von Matcha- und Sencha-Tee. MS-Einstellungen, MS-MS Fragmentierung

Massenspektrometer Micromass Q-ToF UltimaTM API

Messmodus ESI-,	V-Modus
Split	1:20
Massenbereich	100-1000 Da
Kapillarspannung	1,9 kV
Temperatur der Ionenquelle	120 °C
Desolvatationstemperatur	180 °C
TOF-Spannung	9,1 kV
Reflectron	36,00 kV
Pusherzyklus	35 µs
MCP-Spannung	2100 V
Collisionsenergie	18 V

6.3.2 Bestimmung der Peakverteilung bei zweidimensionalen Analysen

Probepvorbereitung *Radix Angelicae sinensis*:

Ca. 200 mg gepulvertes *Radix Angelicae sinensis* wurden eingewogen und mit 2,0 mL Extraktionsmittel (Methanol/Wasser 50 % / 50 %) versetzt und eine Stunde geschüttelt. Nach der Filtration durch PTFE 0,2 µm wurden 400 µL Lösung unter Vakuum eingedampft und wieder in 200 µL Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde zweifach bei 13.000 rpm zwei Minuten lang zentrifugiert. Der klare Überstand wurde nochmals durch PTFE 0,2 µm filtriert.

Verwendete Säulen:

on-line LC x LC	
Erste Dimension	
Säulen	Luna 3µ CN 100A 3µm 150 x 2,0 geschützt durch KrudKatscher ultra (Phenomenex, Aschaffenburg, D)
	Kinetex [®] 1,7µ PFP, 100A 1,7 µm 150 x 2,1 mm geschützt durch KrudKatscher ultra [®] Phenomenex [®] , Aschaffenburg (D)
	Nucleodur [®] 100-3CN-RP 3µm, 250 x 2,0 mm, geschützt durch 100-3CN-RP 3µm 8 x 2,0 Macherey-Nagel, Düren (D)
Zweite Dimension	
Säule	Kinetex [®] 2,6µ C18, 100A 2,6 µm 50 x 3,0 mm geschützt durch KrudKatscher ultra [®] Phenomenex [®] , Aschaffenburg (D)
off-line LC x LC	
Erste Dimension	
Säule	Kinetex [®] 1,7µ PFP, 100A 1,7 µm 150 x 2,1 mm geschützt durch KrudKatscher ultra [®] Phenomenex [®] , Aschaffenburg (D)
Zweite Dimension	
Säule	Kinetex [®] 2,6µ C18, 100A 2,6 µm 50 x 3,0 mm geschützt durch KrudKatscher ultra [®] Phenomenex [®] , Aschaffenburg (D)

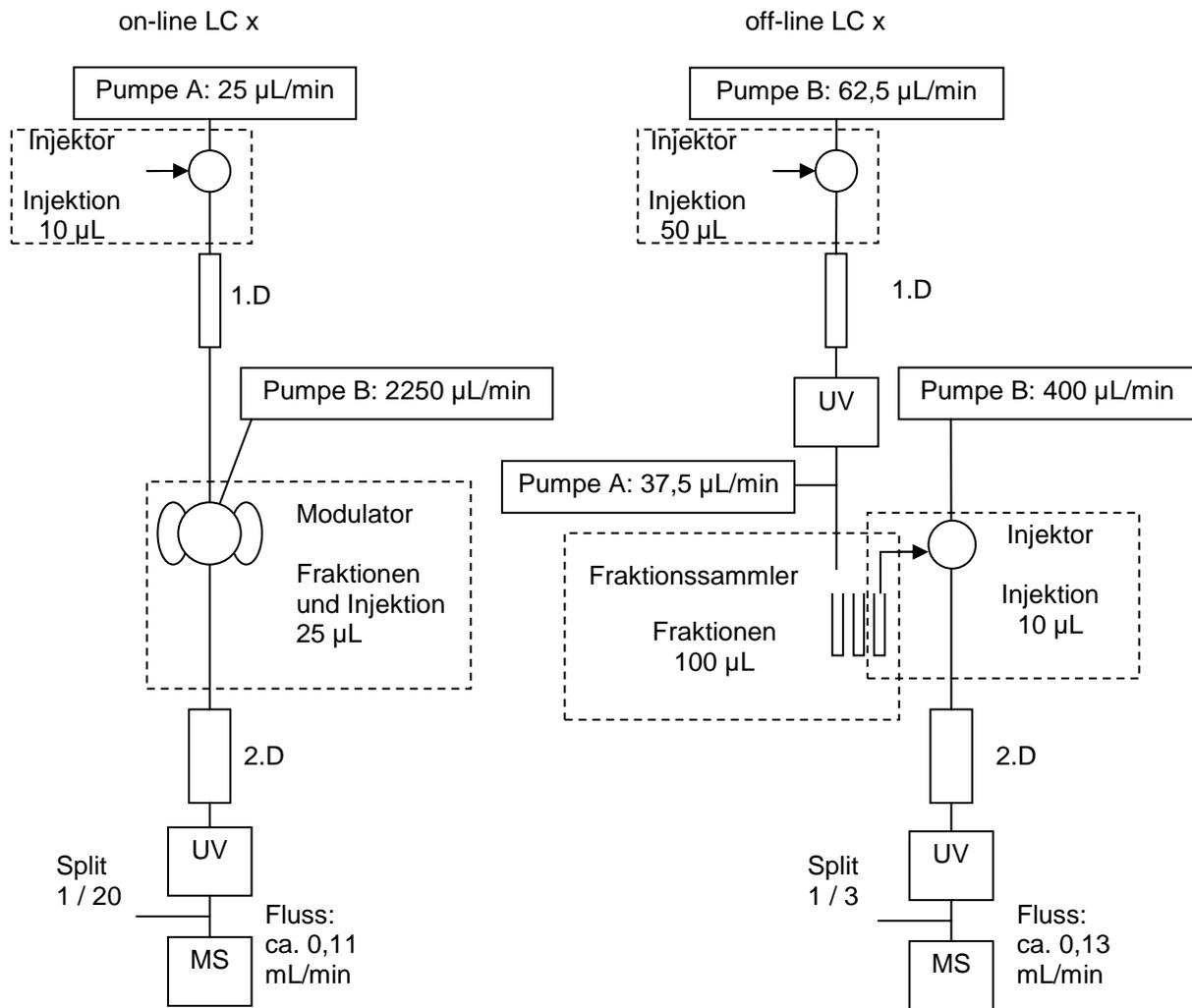


Abbildung 45: Schematischer Vergleich des on-line und off-line LC x LC-Systems. Pumpe A: Alliance 2690 Separations Module, Waters Corporation, Milford (USA). Pumpe B: Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D).

Experimenteller Teil

Methode 6: On-line LC x LC-Analyse von *Radix Angelicae sinensis*

Injektion	10 µL, Probe			
Erste Dimension	HPLC-System Alliance 2690 Separations Module, Waters Corporation, Milford (USA)			
Fluss	0,025 mL/min			
Temperatur	50 °C			
Linearer Gradient	Zeit	Acetononitril		H ₂ O
	[min]	[%]		[%]
	0	0		100
	50	0		100
	150	25		75
	270	90		10
	300	90		10
Modulation	10 Wegeventil, Rheodyne IDEX Health & Science Wertheim-Mondfeld (Germany)			
Modulationszeit	1,00 min			
Schleifen	26 µL			
Zweite Dimension	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (Germany)			
Fluss	2,25 mL/min			
Temperatur	50 °C			
Linearer Gradient	Zeit	H ₂ O	MeOH	1 % HCOOH
	[min]	[%]	[%]	[%]
	1,01	85	10	5
	1,05	85	10	5
	1,70	25	70	5
	1,75	5	90	5
	1,80	5	90	5
	1,85	85	10	5
	2,00	85	10	5
Detektor 1	Shimadzu Prominence DAD SPD - M20A			
Detektoreinstellungen	UV 220-400 nm Sampling 40 Hz Time constant 0,625 Temperatur 50 °C			
Detektor 2	Massenspektrometer Micromass Q-ToF Ultima™ API			
Detektoreinstellungen	Fluss reduziert auf ca. 100 µl/min ESI + 100 – 1000 u Capillary 2,08 kV			
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24 MassLynx 4.0, Waters Corporation, Millford (USA)			
Auswertesoftware	GC Image v. 1.9b5			

Experimenteller Teil

Methode 7: Off-line LC x LC-Analyse von *Radix Angelicae sinensis*

Erste Dimension	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D)			
Injektion	50 µL, Probe			
Fluss	0,0625 mL/min			
Temperatur	50 °C			
Linearer Gradient	Zeit	Acetononitril		H ₂ O
	[min]	[%]		[%]
	0	0		100
	12	0		100
	60	25		75
	100	90		10
120	90		10	
Fraktionierung				
Hilfsfluss	HPLC-System Alliance 2690 Separations Module, Waters Corporation, Milford (USA)			
Lösung	1 % Ameisensäure in Wasser			
Fluss	0,0375 mL/min			
Fraktionssammler	Shimadzu FRC-10A Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D)			
Modulationszeit	1,00 min			
Fraktionsvolumen	100 µL			
Zweite Dimension	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (Germany)			
Injektion	10 µL, Fraktion			
Fluss	0,400 mL/min			
Temperatur	50 °C			
Linearer Gradient	Zeit	H ₂ O	MeOH	1 % HCOOH
	[min]	[%]	[%]	[%]
	0	85	10	5
	10	25	70	5
	11	5	90	5
	12	5	90	5
	13	85	10	5
	15	85	10	5
Detektor 1	Shimadzu Prominence DAD SPD - M20A			
Detektoreinstellungen	UV 220-400 nm Sampling 40 Hz Time constant 0,625 Temperatur 50 °C			
Detektor 2	Massenspektrometer Micromass Q-Tof Ultima™ API			
Detektoreinstellungen	Fluss reduziert auf ca. 120 µl/min ESI + 100 – 1000 u Capillary 2,08 kV			
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24 MassLynx 4.0, Waters Corporation, Millford (USA)			
Auswertesoftware	LCxLC-MS_3_5_1 auf Basis von Labview			

6.3.3 Komprehensive zweidimensionale Analyse von Weißwein

Probenvorbereitung Weißwein:

Untersucht wurde Riesling, feinherb 2011 Mosel „Thörnicher St. Michael“ vom örtlichen Markt (Lidl). Die Probe wurde unmittelbar vor der Analyse hergestellt. Die Flasche wurde dafür geöffnet und 10 mL Wein entnommen. Zu 10 mL Wein wurden 0,75 mL 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ Lösung zugegeben. Nach einem kurzen Entgasen mit Ultraschal betrug der pH-Wert ca. 6,5. Der pH-Wert wurde mit pH-Papier überprüft. Nach der Filtration durch PTFE-Filter stand die Lösung zu Analyse bereit.

Verwendeten Säulen bei der IC x LC-Analyse

Erste Dimension	
Säule / Säulenkombinationen	2 mal SAX PhenoSphere [®] 5 μ 150 mm x 2,0 mm geschützt durch Vorsäule Phenomenex [®] Aschaffenburg (D)
	Kinetex [®] PFP 2,6 μ m 30 mm x 3,0 mm Phenomenex [®] , Aschaffenburg (D)
	2 mal SAX PhenoSphere [®] 5 μ 150 mm x 2,0 mm geschützt durch Vorsäule und Kinetex [®] PFP 2,6 μ m 30 mm x 3,0 mm Phenomenex [®] , Aschaffenburg (D)
Zweite Dimension	
Säule	Kinetex [®] 2,6 μ XB-C18, 100A 2,6 μ m 50 x 3,0 mm geschützt durch Vorsäule Phenomenex [®] , Aschaffenburg (D)

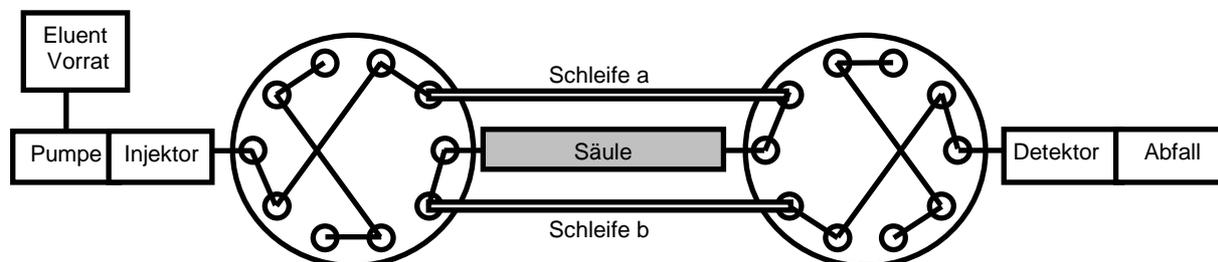
Experimenteller Teil

Methode 8: IC-LC x LC.

Erste Dimension	Methrom 850 Professional IC, Methrom AG, Herisau (CH)			
Injektion	20 µL, Probe mit (NH ₄) ₂ CO ₃ auf pH 6,5 eingestellt			
Fluss	0,09 mL/min			
Temperatur	30 °C			
Linearer Gradient	Zeit	91 mmol/L NH ₄ HCOO in 9,1 % / 90,9% MeOH / H ₂ O		H ₂ O
	[min]	[%]		[%]
	0	13		87
	10	13		87
	60	100		0
	120	100		0
	130	13		87
Spritzenpumpe	Plus 11 Harvard Apparatus, Holliston, (USA)			
Lösung	2,6 mol/L Ameisensäure			
Fluss	0,01 mL/min			
Modulation	10-Wege-Ventil, Rheodyne IDEX Health & Science Wertheim-Mondfeld (Germany)			
Modulationszeit	1,00 min			
Schleifen	100 µL			
Zweite Dimension	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (Germany)			
Fluss	2,25 mL/min			
Temperatur	50 °C			
Linearer Gradient	Zeit	H ₂ O	MeOH	1 % HCOOH
	[min]	[%]	[%]	[%]
	1,00	95	0	5
	1,10	95	0	5
	1,20	85	10	5
	1,60	45	50	5
	1,65	5	90	5
	1,70	5	90	5
	1,80	95	0	5
	2,00	95	0	5
Detektor	Shimadzu Prominence DAD SPD - M20A			
Detektoreinstellungen	UV 220-400 nm Sampling 40 Hz Time constant 0,025 Temperatur 50 °C			
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24			
Auswertesoftware	GC Image v. 1.9b5			

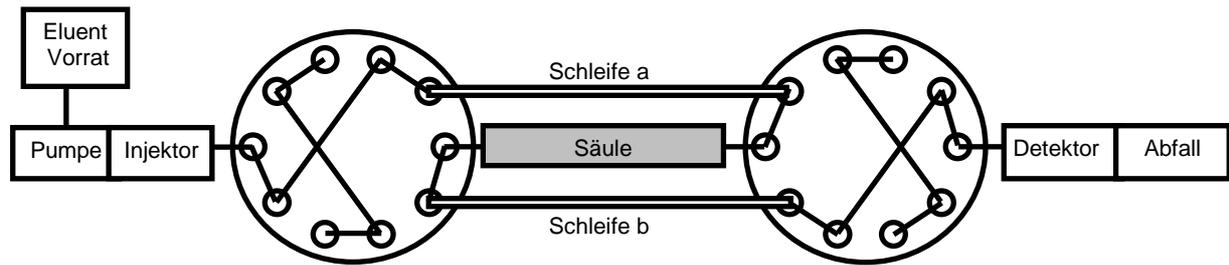
6.3.4 Erstellung einer Moving Solvent Recycling-Chromatographie Methode

Methode 9: Studie zur nichtvollständigen Übertragung von Fraktionen bei der Moving Solvent Recycling Chromatographie.



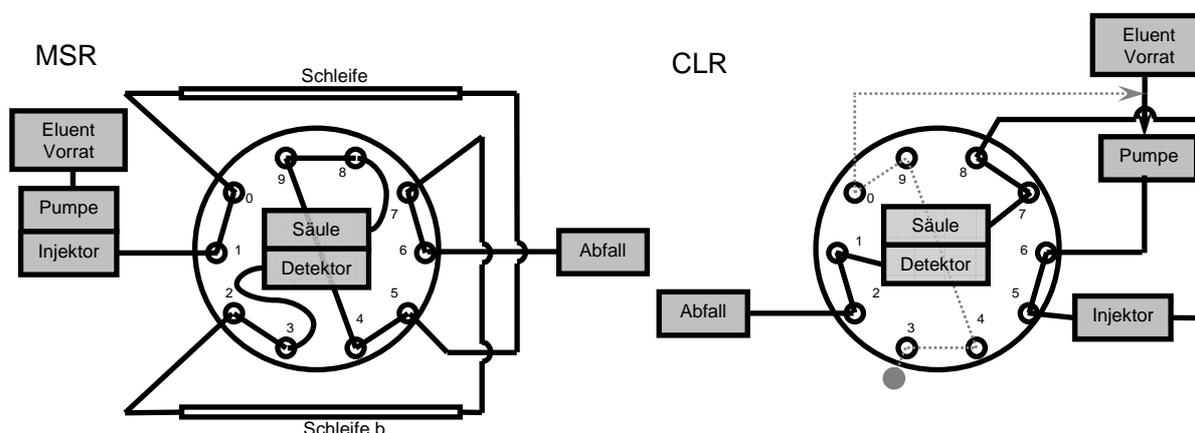
Säule	Chromolith® speed ROD RP-18e 50 x 4,6 mm Merck Darmstadt (D) vor dem Beginn gefüllt mit: 1 % Ameisensäure / 30 % MeOH / 69 % Wasser
Schleife a und b	Kapillare PEEK 0,25 mm ID x 2650 mm V = 130 µL
Zehn-Wege-Ventile	Switchos II LC Packings (NL)
System	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D)
Temperatur	50 °C
Fluss:	von 0,230 mL/min bis 285 mL/min
Isokratisch	0,5 % Ameisensäure / 30 % MeOH / 69,5 % Wasser
Detektor	Shimadzu Prominence DAD SPD – M20A
Detektoreinstellungen	UV 220-400 nm Sampling 40 Hz Time constant 0,025 Temperatur 50 °C
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24

Methode 10: Studie zur nichtvollständigen Übertragung von Fraktionen bei der Moving Solvent Recycling Chromatographie.



Säule	Kapillare PEEK 0,3 mm ID x 500 mm V = 35,5 µL vor dem Beginn geflutet mit 1 % Ameisensäure
Schleife a und b	Kapillare PEEK 0,13 mm ID x 1250 mm V = 16,6 µL
Zehn-Wege-Ventile	Switchos II LC Packings (NL)
System	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D)
Temperatur	30 °C, 50 °C, 70°C
Fluss	0,125 mL/min, 250 mL/min
Isokratisch	Wasser
Detektor	Shimadzu Prominence DAD SPD – M20A
Detektoreinstellungen	UV 220-400 nm Sampling 40 Hz Time constant 0,025 Temperatur 50 °C
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24

Methode 11: Vergleich unterschiedlicher Recycling Methoden



Allgemeine Versuchsbedingungen:

Injektion	1 μL , 0,01 % R(-)-Carvon und S(+)-Carvon gelöst im Eluent
Säule	Nucleodex [®] β -OH EC 200 x 4 mm Macherey Nagel, Düren (D)
Zehn-Wege-Ventile	10 Wegeventil, Rheodyne IDEX Health & Science Wertheim-Mondfeld (Germany)
System	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D)
Temperatur	50 °C
Fluss:	0,470 mL/min
Isokratisch	30 % ACN / 69 % Wasser / 1 % Ameisensäure
Detektor	Shimadzu Prominence DAD SPD – M20A
Detektoreinstellungen	UV 220-400 nm Sampling 40 Hz Time constant 0,025 Temperatur 50 °C
Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24

Versuchsbedingungen MSR:

Schleife a und b	Kapillaren: Stahl 0,25 mm ID x 2650 mm V = 130 μL
Verbindung 4-9	Kapillare: Stahl 0,13 mm ID x 150 mm V = 1,3 μL
Schaltintervale	0,28 min

7 Anhang

Tabelle 17: Vergleich der Säulen für die zweite Dimension anhand von Coffein.

RP 18 Säule	Dimension [mm]	Gradient [min]	Flow [mL/min]	Retention			Breite w_h Koffein [min]	Boden-zahl N	Peak-kapazität n	Druck-abfahl [bar]
				Uracil (td) [min]	Koffein (tdr) [min]	Koffein (tr) [min]				
Kinetex [®]	3x30	1	2,25	1,107	1,625	0,518	0,021	3377	28	300
Kinetex [®]	3x30	1	3,00	1,086	1,545	0,459	0,021	2651	28	425
Kinetex [®]	3x30	2	2,25	1,106	1,780	0,674	0,025	4034	47	310
Kinetex [®]	3x30	2	3,00	1,081	1,665	0,584	0,030	2103	39	425
Kinetex [®]	3x50	1	2,25	1,151	1,825	0,674	0,027	3458	22	530
Kinetex [®]	3x50	1	3,00					Keine Messung durchgeführt		
Kinetex [®]	3x50	2	2,25	1,147	2,062	0,915	0,039	3055	30	530
Kinetex [®]	3x50	2	3,00					Keine Messung durchgeführt		
Kinetex [®]	4.6x30	1	2,25	1,192	1,905	0,713	0,030	3135	20	160
Kinetex [®]	4.6x30	1	3,00	1,154	1,817	0,663	0,034	2110	17	228
Kinetex [®]	4.6x30	2	2,25	1,196	2,237	1,041	0,040	3759	29	160
Kinetex [®]	4.6x30	2	3,00	1,147	2,091	0,944	0,047	2239	25	228
Halo [®]	4.6x50	1	2,25	1,253	2,053	0,800	0,028	4531	21	260
Halo [®]	4.6x50	1	3,00	1,196	1,981	0,785	0,030	3800	20	350
Halo [®]	4.6x50	2	2,25	1,249	2,352	1,103	0,041	4017	29	260
Halo [®]	4.6x50	2	3,00	1,199	2,324	1,125	0,047	3180	25	350
Monolith [®]	4,6x50	1	2,25	1,409	2,276	0,867	0,034	3609	17	75
Monolith [®]	4,6x50	1	3,00	1,312	2,101	0,789	0,035	2820	17	100
Monolith [®]	4,6x50	2	2,25	1,409	2,682	1,273	0,046	4250	26	75
Monolith [®]	4,6x50	2	3,00	1,307	2,467	1,160	0,047	3381	25	100

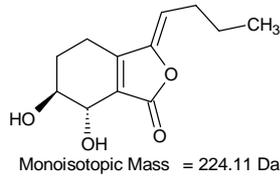
Tabelle 18: Bestimmung der Säuleneigenschaften nach Neue-Test [68]. Normierung ist im Text beschrieben

Säule		1. Dimension			2 Dimension
		Kinetex [®] PFP 2,1 x 150	Luna [®] CN 2 x 150	Machery Nagel CN 2,1 x 250	Kinetex [®] RP 18 3 x 50
Dimensionen der Säule [mm]					
t _{dr} [min]	Uracil	3,37	1,78	6,70	0,42
	Naphthalen	10,69	2,33	9,81	1,69
	Acenaphthen	19,32	2,51	10,81	3,30
	Propranolol	26,08	8,64	13,58	0,87
	Amitriptylin	51,00	8,49	17,63	5,00
	Butylparaben	7,56	1,87	8,14	1,09
	Dipropylphthalat	12,28	2,03	9,15	1,72
k	Uracil				
	Naphthalen	2,17	0,31	0,46	3,05
	Acenaphthen	4,73	0,41	0,61	6,89
	Propranolol	6,74	3,85	1,03	1,09
	Amitriptylin	14,13	3,77	1,63	10,96
	Butylparaben	1,24	0,05	0,21	1,61
	Dipropylphthalat	2,64	0,14	0,37	3,12
Charakterisierung des Säulenmaterials nach [68]					
Silanolische Wechselw.	S	3,52	3,94	2,81	2,99
Polare Wechselw.	E	0,10	0,44	-0,31	-1,55
Phenolische Wechselw.	P	-0,65	-1,27	-0,64	-0,54
Hydrophobe Wechselw.	v	0,031	0,015	0,019	0,034

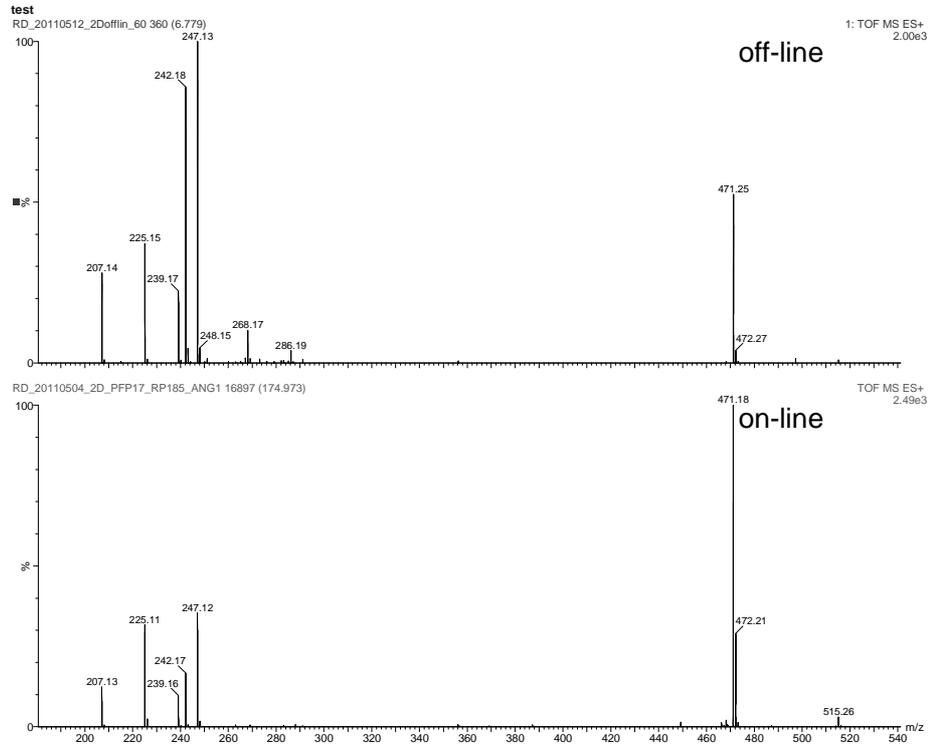
Vergleich der Spektren der on-line und off-line LC x LC-Methoden

Senkyunolide I

MS ES-positiv



Spezies	m/z
[M+H] ⁺	225
[M-OH] ⁺	207
[M+NH ₄] ⁺	242
[M+Na] ⁺	247
[2M+Na] ⁺	471



UV-Spektrum

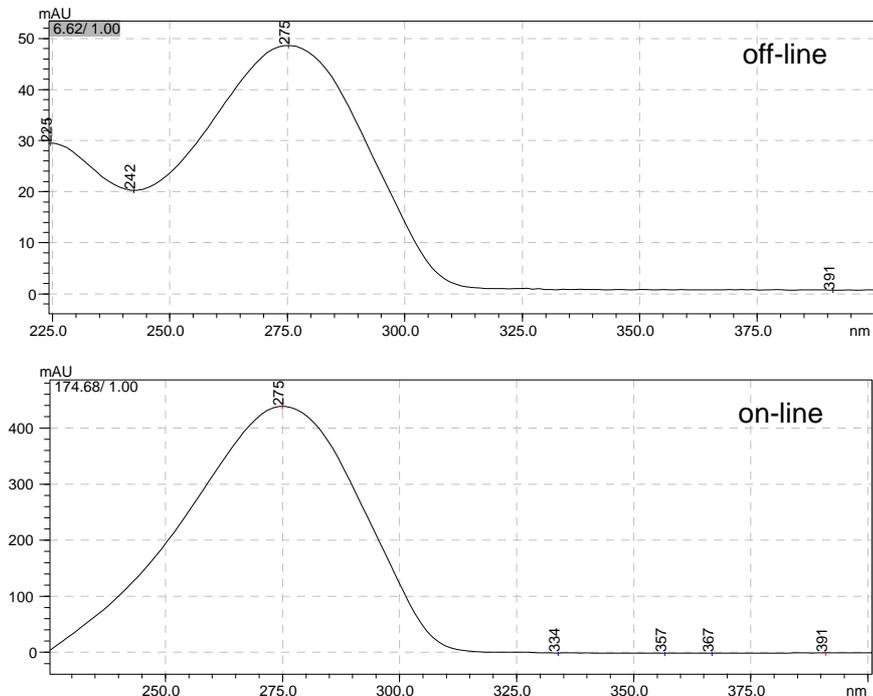
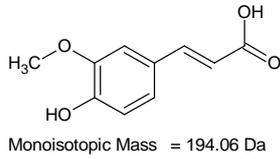


Abbildung 46: Vergleich der Spektren von Senkyunolide I.

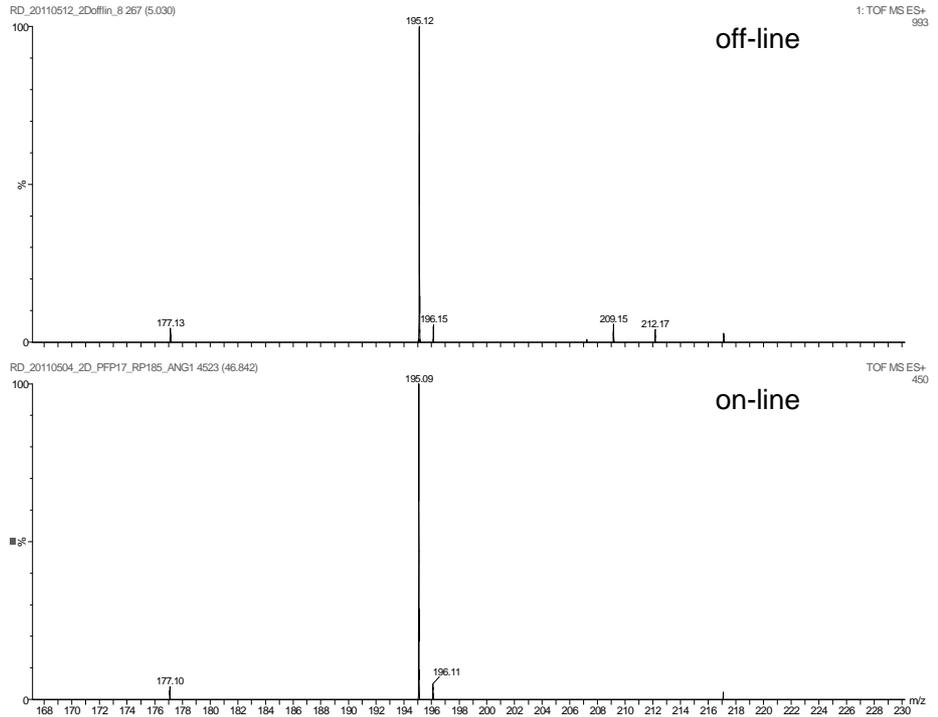
Identifizierung erfolgte anhand des Retentionsverhaltens und der UV-Spektren im Vergleich zu Wang et.al. [176] und des MS ESI-positiv Spektrums.

Ferulasäure

MS ESI-positiv



Spezies	m/z
[M+H] ⁺	195
[M-OH] ⁺	177
[M+NH ₄] ⁺	212
[M+Na] ⁺	217



UV-Spektrum

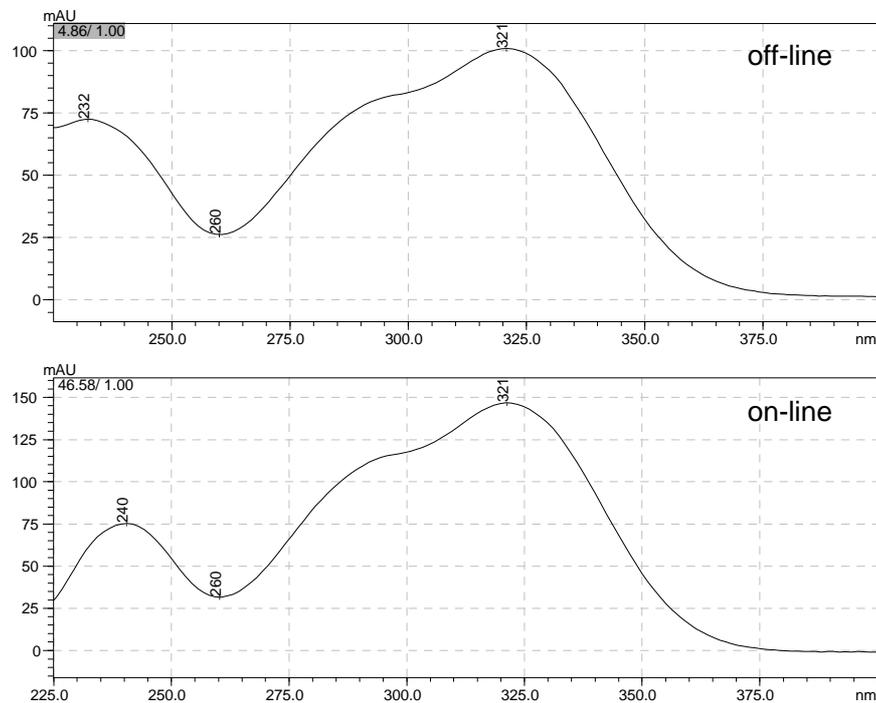


Abbildung 47: Vergleich der Spektren von Ferulasäure.

Identifizierung erfolgte anhand des Retentionsverhaltens im Vergleich zu Huang et.al. [177]; des MS ESI-positiv- und UV-Spektrums.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Retentionszeiten für die Analyse von 12 Standards und einer unbekannter Komponente mit drei unterschiedlichen comprehensiven zweidimensionalen Methoden.

Standard	Erste Dimension			Zweite Dimension
	2*SAX	PFP	2*SAX-PFP	RP-18
	[min]	[min]	[min]	[min]
L-Ascorbinsäure (Na-Salz)	35	3	35	0,14
Nicotinsäure	47	5	48	0,19
Gallussäure	90	3	75	0,25
4-Hydroxybenzoesäure	60	4	54	0,56
(+)-Catechin	26	57	69	0,58
4-Hydrophenylsäure	54	5	51	0,61
Unbekanntes Analyt	49	5	49	0,63
Phthalaldehydsäure	44	5	48	0,72
2,6-Dihydroxybenzoesäure	63	33	78	0,80
Benzoessäure	55	5	56	0,81
4-Metyloxyphenylelessigsäure	51	5	56	0,83
Salycilsäure (Na-Salz)	61	13	64	0,84
2-Methylbenzoesäure	54	5	51	0,87

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines HPLC-Systems	5
Abbildung 2: Fundamentale Größen in einem Chromatogramm	6
Abbildung 3: Faktoren der Peakverbreiterung in der Flüssigchromatographie. A: Eddy-Diffusion, B: longitudinale Diffusion, C: Massentransporteffekte	9
Abbildung 4: Kurvenverlauf der van-Deemter-Gleichung und die einzelnen Beiträge zur Peakverbreiterung in der Flüssigchromatographie: Eddy-Diffusion (A), longitudinale Diffusion (B), Massentransporteffekte (C).	10
Abbildung 5: Laminare Rohrströmung [13]	11
Abbildung 6: Zweidimensionale DC-Analyse von 23 Ribonucleotiden [26]	14
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines on-line LC x LC-Systems. Die erste und zweite Dimension sind über ein Zehn-Wege-Ventil verbunden. In der Position A erreicht das Eluat der ersten Dimension über das Ventil die erste Schleife. Nach dem Schalten des Ventils in Position B wird das gesammelte Eluat mit Hilfe der zweiten Pumpe in die zweite Dimension überführt und dort einer erneuter Trennung unterzogen. Gleichzeitig wird das Eluat der ersten Dimension in der zweiten Schleife gesammelt. Nach erneutem Schalten in die Position A wird das gesammelte Eluat aus der zweiten Schleife in die zweite Dimension überführt und der Prozess beginnt von vorne.	16
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Abhängigkeit des Nobuofaktors n_F von der Modulationsperiode P_M/σ [44], berechnet nach [48]	18
Abbildung 9: Fraktionierung des Gaußpeaks mit der Modulation von 2σ . Es können so drei bis vier Fraktionen gebildet werden. A: Fraktion in Peakphase $\varphi = 0$. Peak wird in drei Fraktionen unterteilt. B: Fraktion in der Peakphase $\varphi = 0,5$. Peak wird in vier Fraktionen unterteilt. Die Phase des Peaks (φ) kann die Werte von 0 bis 1 annehmen [50].	18
Abbildung 10: Erstellung eines zweidimensionalen Chromatogramms: A: Eindimensionale Darstellung des zweidimensionalen Chromatogramms; B: Zuschnitt des Chromatogramms in gleiche Abschnitte; C: Vereinfachte Darstellung eines zweidimensionalen Chromatogramms; D: Spotdarstellung eines zweidimensionalen Chromatogramms; Rot: Systempeak; Schwarz Analyt a, Blau: Analyt b.	20

- Abbildung 11: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Trennung der ersten und der zweiten Dimension als Logarithmus der Retentionsfaktoren ($\log k$). Links: Vollkommene Übereinstimmung der Trennmechanismen. Rechts: Umgekehrte vollkommene Übereinstimmung der Trennmechanismen [67]. 21
- Abbildung 12: A: closed-loop recycling chromatography. B: alternate pumping recycling chromatography 23
- Abbildung 13: Standards des Neue-Tests 34
- Abbildung 14: Graphische Darstellung der Parameter des Neue-Testes für folgende Säulen: Kinetex[®]-RP18, Kinetex[®]-PFP, Luna[®] CN-Phase (alle von Phenomenex[®]), CN-Phase (Machery-Nagel). Gezeigt sind ebenfalls die dokumentierten Werte für die jeweilige Wechselwirkungen [68]. 35
- Abbildung 15: Eindimensionale Messung der zweiten Dimension. Probe: *Radix Angelicae sinensis*; HALO RP18-Phase 4,6 x 30. Gradient: eine Minute; Fluss: 3 mL/min; Detektor: UV bei 277 nm. Die Analyse beginnt nach der zweiten Minute. 38
- Abbildung 16: Schematische Darstellung der Verbindung der Stahlkapillare der ESI-Quelle mit der HPLC-Kapillare. a: Stahlkapillare, b: Teflonummantelung, c: PEEK-Anschlüsse, d: Kupplung aus PEEK, e: Ferrul, f: PEEK-Kapillare von der HPLC. Die rot markierte Fläche stellt das Totvolumen dar. 39
- Abbildung 17: Eindimensionale Messung der zweiten Dimension. HALO RP18 4,6 mm x 30 mm. Gradientdauer: eine Minute; Injektion nach 2 min; Fluss: 3 mL/min; Detektor: ESI Positiv TOF-MS. A: EIC $m/z = 169$ vor der Optimierung, B EIC $m/z = 169$ nach der Optimierung. 39
- Abbildung 18: LCxLC Chromatogramm von Matcha-Tee. Es wurde eine Cyanophase in der ersten und eine RP-18-Phase in der zweiten Dimension verwendet. Detektione ESI(-)-TOFMS 42
- Abbildung 19: Ausschnitt der Chromatogramme zweier LC x LC-(ESI)-MS-Analysen vom Matcha- und Sencha-Tee. In den oberen Chromaogrammen ist der EIC $m/z = 289$ ($M - H$)⁻ von (-)-Epicatechin dargestellt. 44
- Abbildung 20: Auswahl der Verteilungen in der zweidimensionalen Chromatographie nach [152]; Erweitert um BOO 47
- Abbildung 21: Zweidimensionale DC-Analyse von 23 Ribonucleotiden [26]. Erweitert um die geometrische Anordnung FAN 48

- Abbildung 22: Einfluss von nicht-orthogonalen Trennmechanismen in einem zweidimensionalen Chromatogramm mit direkter Korrelation. Gezeigt ist eine schematische zweidimensionale Darstellung einer LC x LC-Analyse mit dem effektiven Winkel β [153]. Alle für die Berechnung der effektiven Fläche nach Liu et. al. [66] notwendigen Größen sind eingezeichnet. 48
- Abbildung 23: Schematische Darstellung eines unregelmäßigen Vierecks im zweidimensionalen Raum, beschrieben durch die Vektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} . 50
- Abbildung 24: Schematische Darstellung von der Auflösung zweier Peaks in komprehensiven zweidimensionalen Analyse, nach [45]. 53
- Abbildung 25: LC x LC-Analyse eines Extraktes von *Radix Angelicae sinensis* mit drei unterschiedlichen Säulenkombinationen. A) Nucleodur[®] x Kinetex[®] RP18; B) Luna[®] x Kinetex[®] RP18; C) Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18. Links ist die Bestimmung der effektiven Fläche nach Liu et al [66] und rechts die Bestimmung der effektiven Fläche unter der Verwendung der Vektoren gezeigt. TIC, Detektion erfolgte mit qTOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) im ESI positiv Modus. 57
- Abbildung 26: LC x LC-Analyse eines Extraktes von *Radix Angelicae sinensis* mit der Säulenkombination Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18. Die effektive Peakfläche wird durch ein unregelmäßiges Fünfeck beschrieben. TIC, die Detektion erfolgte mit einem qTOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) im ESI-positiv Modus. 58
- Abbildung 27: off-line LC x LC-Analyse von *Radix Angelicae sinensis* mit der Säulenkombination Kinetex[®] PFP x Kinetex[®] RP18. Die effektive Peakfläche wird durch ein unregelmäßiges Fünfeck beschrieben. TIC, die Detektion erfolgte mit einem qTOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) im ESI-positiv Modus. 61
- Abbildung 28: Kohlensäure-Hydrogencarbonat-Gleichgewicht 65
- Abbildung 29: Schematische Darstellung der komprehensiven zweidimensionalen IC-LC x LC. 66
- Abbildung 30: SAX-SAX x RP18 Analyse der 14-Komponenten-mischung. Die Detektion erfolgte bei 254 nm. 67
- Abbildung 31: PFP x RP18-Analyse der 14-Komponentenmischung. Bedingungen sind analog zur Analyse in Abbildung 30. 69

- Abbildung 32: SAX-SAX-PFP x RP18-Analyse der 14-Komponentenmischung. Bedingungen sind analog zur Analyse in Abbildung 30. 69
- Abbildung 33: IC x LC-Analyse des Rieslings. Säulenkombination SAX-SAX x RP18. Methode ist analog zu der in Abbildung 30. A: Ascorbinsäure; B: Weinsäure; C: Äpfelsäure; D: Zitronensäure. 72
- Abbildung 34: LC x LC-Analyse des Rieslings. Säulenkombination PFP x RP18. Methode ist analog zur in der Abbildung 30 gezeigten. 72
- Abbildung 35: IC-LC x LC-Analyse des Rieslings. Säulenkombination SAX-SAX-PFP x RP 18. Methode ist analog zu der im Abbildung 30. 73
- Abbildung 36: Schematische Darstellung der „Moving Solvent Recycling-HPLC“ mit einem Zehn-Wege-Ventil. 75
- Abbildung 37: MSR-HPLC. A und B: Schaltung mit 2 Zehn-Wege-Ventilen. An Stelle einer Säule wurde eine Kapillare eingebaut und mit 1 % Ameisensäure geflutet. Als Eluent wurde Wasser eingesetzt. C: Chromatogramm der Recycling HPLC. Bei jeder Modulation verlässt ein Teil der Ameisensäure den Kreislauf (regelmäßig auftretende Peaks). Nachdem das Recycling gestoppt wurde, verlässt die restliche Ameisensäure das System. 77
- Abbildung 38: Schematische Darstellung des Eluats in der Sammelschleife mit Schaltungsvorgängen. 78
- Abbildung 39: Verlust des Eluats aus dem Kreislauf in Abhängigkeit von der Füllrate der Probeschleifen. Temperatur: 50 °C, Schleifenvolumen: 130 µL, Modulationszeit 0,50 min, Fluss: 235 µL/min bis 285 µL/min. 79
- Abbildung 40: Verlust des Eluats aus dem Kreislauf in Abhängigkeit von der Temperatur bei einem Fluss von 250 µL/min (A) und dem Fluss bei 70 °C (B); Kapillare 35,5 µL; Volumen der Sammelschleifen 16,6 µL. 80
- Abbildung 41: Schematische Darstellung der Schaltung der MSR und CLR. Das Recycling bei der MSR erfolgt indem das Ventil zwischen den Positionen A und B in regelmäßigen Abständen geschaltet wird. Das Recycling bei der CLR wird nach der Injektion (Position A) durch das Schalten des Zehn-Wege-Ventils in Position B gestartet. Solange das Ventil in Position B ist, erfolgt Recycling. Durch das Schalten des Ventils zurück in Position A verlassen die Analyten das Recyclingsystem. 82
- Abbildung 42: Chromatogramme zum Vergleich der Trennung mit MSR und CLR. 82

- Abbildung 43: Vergleich der Trennleistung der Systeme MSR und CLR. A: Bodenzahl; B: Auflösung. 83
- Abbildung 44: Links: Summe der Flächen beider Peaks. Rechts: Prozentuelle Zusammensetzung des Doppelpeaks nach jedem Recyclingschritt (Bestimmung der Fläche bei 240 nm) bei MSR. 84
- Abbildung 45: Schematischer Vergleich des on-line und off-line LC x LC-Systems. Pumpe A: Alliance 2690 Separations Module, Waters Corporation, Milford (USA). Pumpe B: Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg (D). 100
- Abbildung 46: Vergleich der Spektren von Senkyunolide I. 110
- Abbildung 47: Vergleich der Spektren von Ferulasäure. 111

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Säulen für die zweite Dimension anhand von Koffein	31
Tabelle 2: Bestimmung der Säuleneigenschaften nach Neue [68].	35
Tabelle 3: Gradient in der zweiten Dimension für die Analyse von Matcha-Tee. Modulationsdauer: 2min, Fluss 3,00 mL/min	41
Tabelle 4: Übersicht der identifizierten Inhaltstoffe im Matcha-Tee [144].	42
Tabelle 5: Bestimmung des Catechinsgehaltes in Sencha- und Matcha-Tee	43
Tabelle 6: Vergleich der Catechine im Matcha- und Sencha-Tee	45
Tabelle 7: Gradienten in der ersten und in der zweiten Dimension. Der Gradient der zweiten Dimension wurde 300-mal pro Analyse wiederholt.	55
Tabelle 8: Bestimmung der effektiven Fläche und der Orthogonalität nach Methode 1	56
Tabelle 9: Bestimmung der effektiven Fläche und der Orthogonalität nach Methode 2	56
Tabelle 10: Vergleich der effektiven Flächen und der Orthogonalität für die Säulenkombination PFP x RP18.	59
Tabelle 11: Vergleich dreier Säulenkombinationen zur Untersuchung eines Extraktes von <i>Radix Angelicae sinensi</i> .	59
Tabelle 12: Vergleich der on-line und der off-line LC x LC-Methode. Bei der Analyse des Extraktes von <i>Radix Angelicae sinensis</i> anhand der Peakkapazität und der Orthogonalität.	62
Tabelle 13: Vergleich der on-line und off-line LC x LC-Methode zur Analyse von <i>Radix Angelicae sinensis</i> anhand der Peakkapazität, der Analysenzeit, des Eluentenverbrauchs (ACN und MeOH) und der Anzahl der detektierten Spots.	62
Tabelle 14: Eine Auswahl der phenolischen Komponenten im Weißwein [112] und ihre pK _S -Werte.	65
Tabelle 15: Vergleich der drei comprehensiven zweidimensionalen Analysen von Wein.	73
Tabelle 16: Vergleich der Recyclingverfahren in der Chromatographie.	85
Tabelle 17: Vergleich der Säulen für die zweite Dimension anhand von Coffein.	108
Tabelle 18: Bestimmung der Säuleneigenschaften nach Neue-Test [68]. Normierung ist im Text beschrieben	109
Tabelle 19: Zusammenfassung der Retentionszeiten für die Analyse von 12 Standards und einer unbekannter Komponente mit drei unterschiedlichen comprehensiven zweidimensionalen Methoden.	112

8 Literaturverzeichnis

- [1] Cammann, K.; „*Instrumentelle Analytische Chemie*“; **1. Auflage**, Spektrum Akademischer Verlag (2001)

- [2] Skoog, D. A. und Leary, J. J.; „*Principles of Instrumental Analysis*“; **4st Edition**, Saunders College Publishing (1992)

- [3] Schwedt, G.; „*Chromatographische Trennmethoden*“; **3. erweiterte Auflage**, Georg Thieme Verlag (1994)

- [4] Ikegami, T., Hara, T., Kimura, H., Kobayashi, H., Hosoya, K., Cabrera, K. und Tanaka, N.; „*Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography using two monolithic silica C18 columns and different mobile phase modifiers in the two dimensions*“; *Journal of Chromatography A*; **1106** (2006) 112 - 117

- [5] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. und Crouch, S. R.; „*Analytical Chemistry*“; **7th Edition**, Harcourt College Publishers (2000)

- [6] Carr, P. W., Wang, X. L. und Stoll, D. R.; „*Effect of Pressure, Particle Size, and Time on Optimizing Performance in Liquid Chromatography*“; *Analytical Chemistry*; **81** (2009) 5342 - 5353

- [7] Vandemter, J. J., Zuiderweg, F. J. und Klinkenberg, A.; „*Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer As Causes of Nonideality in Chromatography*“; *Chemical Engineering Science*; **5** (1956) 271 - 289

- [8] Gritti, F. und Guiochon, G.; „*Comparative study of the performance of columns packed with several new fine silica particles Would the external roughness of the particles affect column properties?*“; *Journal of Chromatography A*; **1166** (2007) 30 - 46

- [9] Gritti, F. und Guiochon, G.; „*The current revolution in column technology: How it began, where is it going?*“; *Journal of Chromatography A*; **1228** (2012) 2 - 19

- [10] Desmet, G. und Broeckhoven, K.; „*Equivalence of the Different C(m)- and C(s)-Term Expressions Used in Liquid Chromatography and a Geometrical Model Uniting Them*“; Analytical Chemistry; **80** (2008) 8076 - 8088
- [11] Gritti, F., Cavazzini, A., Marchetti, N. und Guiochon, G.; „*Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C-18-bonded silica materials*“; Journal of Chromatography A; **1157** (2007) 289 - 303
- [12] Cavazzini, A., Gritti, F., Kaczmarski, K., Marchetti, N. und Guiochon, G.; „*Mass-transfer kinetics in a shell packing material for chromatography*“; Analytical Chemistry; **79** (2007) 5972 - 5979
- [13] Wieghardt, K.; „*Theoretische Strömungslehre*“; **second**, B. G. Teubner (1974) 36 - 38
- [14] Karger, B. L., Martin, M. und Guiochon, G.; „*Role of Column Parameters and Injection Volume on Detection Limits in Liquid-Chromatography*“; Analytical Chemistry; **46** (1974) 1640 - 1647
- [15] Poppe, H.; „*Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods*“; Journal of Chromatography A; **778** (1997) 3 - 21
- [16] Gibbings, J.C.; „*Maximum Number of Components Resolvable by Gel Filtration and Other Elution Chromatographic Methods*“; Analytical Chemistry; **39** (1967) 1027 - 1028
- [17] Vivo-Truyols, G., van der Wal, S. und Schoenmakers, P. J.; „*Comprehensive Study on the Optimization of Online Two-Dimensional Liquid Chromatographic Systems Considering Losses in Theoretical Peak Capacity in First- and Second-Dimensions: A Pareto-Optimality Approach*“; Analytical Chemistry; **82** (2010) 8525 - 8536
- [18] Dolan, J. W., Lommen, D. C. und Snyder, L. R.; „*Drylab Computer-Simulation for High-Performance Liquid-Chromatographic Method Development .2. Gradient Elution*“; Journal of Chromatography; **485** (1989) 91 - 112

- [19] Dolan, J. W., Snyder, L. R., Djordjevic, N. M., Hill, D. W. und Waeghe, T. J.; „*Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time I. Peak capacity limitations*“; Journal of Chromatography A; **857** (1999) 1 - 20
- [20] Kuehnle, M., Rehbein, J., Holtin, K., Dietrich, B., Gradl, M., Yeman, H. und Albert, K.; „*Phase optimized liquid chromatography as an instrument for steroid analysis*“; Journal of Separation Science; **31** (2008) 1655 - 1661
- [21] Pol, J. und Hyotylainen, T.; „*Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry*“; Analytical and Bioanalytical Chemistry; **391** (2008) 21 - 31
- [22] Blumberg, L. und Klee, M. S.; „*A critical look at the definition of multidimensional separations*“; Journal of Chromatography A; **1217** (2010) 99 - 103
- [23] Willmott, F. W., Mackenzie, I. und Dolphin, R. J.; „*Microcomputer-Controlled Column Switching-System for High-Performance Liquid-Chromatography*“; Journal of Chromatography; **167** (1978) 31 - 39
- [24] Freeman, D. H.; „*Ultrasensitivity Through Column Switching and Mode Sequencing in Liquid-Chromatography - Review*“; Analytical Chemistry; **53** (1981) 2 - 5
- [25] Consden, R., Gordon, A. H. und Martin, A. J. P.; „*Qualitative Analysis of Proteins: a Partition Chromatographic Method Using Paper*“; Biochemical Journal; (1944)
- [26] Randerath, E. und Randerath, K.; „*Resolution of Complex Nucleotide Mixtures by 2-Dimensional Anion-Exchange Thin-Layer Chromatography*“; Journal of Chromatography; **16** (1964) 126
- [27] Chmielewicz, Z. F. und Acara, M.; „*Quantitative 2-Dimensional Thin-Layer Chromatography of Deoxyribonucleic Acid Components*“; Analytical Biochemistry; **9** (1964) 94

- [28] Yasuda, S. K.; „*Identification of N-Nitroso- + Nitrodiphenylamines by 2-Dimensional Thin-Layer Chromatography*“; Journal of Chromatography; **14** (1964) 65
- [29] Randerath, E. und Randerath, K.; „*Resolution of Complex Nucleotide Mixtures by 2-Dimensional Anion-Exchange Thin-Layer Chromatography*“; Journal of Chromatography; **16** (1964) 126
- [30] Hodgson, E., Smith, E. und Guthrie, F. E.; „*2-Dimensional Thin-Layer Chromatography of Tobacco Alkaloids and Related Compounds*“; Journal of Chromatography; **20** (1965) 176
- [31] Guiochon, G., Marchetti, N., Mriziq, K. und Shalliker, R. A.; „*Implementations of two-dimensional liquid chromatography*“; Journal of Chromatography A; **1189** (2008) 109 - 168
- [32] Marchetti, N., Fairchild, J. N. und Guiochon, G.; „*Comprehensive off-line, two-dimensional liquid chromatography. Application to the separation of peptide digests*“; Analytical Chemistry; **80** (2008) 2756 - 2767
- [33] Kalili, K. M. und de Villiers, A.; „*Off-line comprehensive 2-dimensional hydrophilic interaction x reversed phase liquid chromatography analysis of procyanidins*“; Journal of Chromatography A; **1216** (2009) 6274 - 6284
- [34] Stoll, D. R.; „*Guidelines for bioanalytical 2D chromatography method development and implementation*“; Bioanalysis; **2** (2010) 105 - 122
- [35] Stoll, D. R., Wang, X. L. und Carr, P. W.; „*Comparison of the practical resolving power of one- and two-dimensional high-performance liquid chromatography analysis of metabolomic samples*“; Analytical Chemistry; **80** (2008) 268 - 278
- [36] Gilar, M., Daly, A. E., Kele, M., Neue, U. D. und Gebler, J. C.; „*Implications of column peak capacity on the separation of complex peptide mixtures in single- and two-dimensional high-performance liquid chromatography*“; Journal of Chromatography A; **1061** (2004) 183 - 192

- [37] Gray, M. J., Sweeney, A. P., Dennis, G. R., Wormell, P. und Shalliker, R. A.; „*Selectivity and the separation of isomers of low molecular weight polystyrenes*“; Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies; **27** (2004) 2905 - 2920
- [38] Wei, Y. L., Lan, T., Tang, T., Zhang, L. Y., Wang, F. Y., Li, T., Du, Y. P. und Zhang, W. B.; „*A comprehensive two-dimensional normal-phase x reversed-phase liquid chromatography based on the modification of mobile phases*“; Journal of Chromatography A; **1216** (2009) 7466 - 7471
- [39] Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M. und Yates, J. R.; „*Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry*“; Nature Biotechnology; **17** (1999) 676 - 682
- [40] Wolters, D. A., Washburn, M. P. und Yates, J. R.; „*An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics*“; Analytical Chemistry; **73** (2001) 5683 - 5690
- [41] Erni, F. und Frei, R. W.; „*2-Dimensional Column Liquid-Chromatographic Technique for Resolution of Complex-Mixtures*“; Journal of Chromatography; **149** (1978) 561 - 569
- [42] Mondello, L., Tranchida, P. Q., Stanek, V., Jandera, P., Dugo, G. und Dugo, P.; „*Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis*“; Journal of Chromatography A; **1086** (2005) 91 - 98
- [43] Dugo, P., Cacciola, F., Kumm, T., Dugo, G. und Mondello, L.; „*Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications*“; Journal of Chromatography A; **1184** (2008) 353 - 368
- [44] Horie, K., Kimura, H., Ikegami, T., Iwatsuka, A., Saad, N., Fiehn, O. und Tanaka, N.; „*Calculating optimal modulation periods to maximize the peak capacity in two-dimensional HPLC*“; Analytical Chemistry; **79** (2007) 3764 - 3770

- [45] Murphy, R. E., Schure, M. R. und Foley, J. P.; „*Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography*“; Analytical Chemistry; **70** (1998) 1585 - 1594
- [46] Li, X. P., Stoll, D. R. und Carr, P. W.; „*Equation for Peak Capacity Estimation in Two-Dimensional Liquid Chromatography*“; Analytical Chemistry; **81** (2009) 845 - 850
- [47] Davis, J. M., Stoll, D. R. und Carr, P. W.; „*Effect of first-dimension undersampling on effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations*“; Analytical Chemistry; **80** (2008) 461 - 473
- [48] Gu, H. W., Huang, Y. A. und Carr, P. W.; „*Peak capacity optimization in comprehensive two dimensional liquid chromatography: A practical approach*“; Journal of Chromatography A; **1218** (2011) 64 - 73
- [49] Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Dugo, G. und Dugo, P.; „*Comprehensive two-dimensional gas chromatography in combination with rapid scanning quadrupole mass spectrometry in perfume analysis*“; Journal of Chromatography A; **1067** (2005) 235 - 243
- [50] Seeley, J. V.; „*Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography*“; Journal of Chromatography A; **962** (2002) 21 - 27
- [51] Meyer, V. R.; „*The 1000 bar and 24 hour limits of one-dimensional HPLC-graphical representations*“; Analytical and Bioanalytical Chemistry; **396** (2010) 1633 - 1640
- [52] Tschappat, V., Varesio, E., Signor, L. und Hopfgartner, G.; „*The application of 2-D dual nanoscale liquid chromatography and triple quadrupole-linear ion trap system for the identification of proteins*“; Journal of Separation Science; **28** (2005) 1704 - 1711

- [53] Fairchild, J. N., Horvath, K. und Guiochon, G.; „*Theoretical advantages and drawbacks of on-line, multidimensional liquid chromatography using multiple columns operated in parallel*“; Journal of Chromatography A; **1216** (2009) 6210 - 6217
- [54] Francois, I., Cabooter, D., Sandra, K., Lynen, F., Desmet, G. und Sandra, P.; „*Tryptic digest analysis by comprehensive reversed phase x two reversed phase liquid chromatography (RP-LC x 2RP-LC) at different pH's*“; Journal of Separation Science; **32** (2009) 1137 - 1144
- [55] Tanaka, N. et al.; „*Simple and comprehensive two-dimensional reversed-phase HPLC using monolithic silica columns*“; Analytical Chemistry; **76** (2004) 1273 - 1281
- [56] Jandera, P., Hajek, T. und Cesla, P.; „*Effects of the gradient profile, sample volume and solvent on the separation in very fast gradients, with special attention to the second-dimension gradient in comprehensive two-dimensional liquid chromatography*“; Journal of Chromatography A; **1218** (2011) 1995 - 2006
- [57] Dugo, P., Fernandez, M. D., Cotroneo, A., Dugo, G. und Mondello, L.; „*Optimization of a comprehensive two-dimensional normal-phase and reversed-phase liquid chromatography system*“; Journal of Chromatographic Science; **44** (2006) 561 - 565
- [58] Dugo, P., Skerikova, V., Kumm, T., Trozzi, A., Jandera, P. und Mondello, L.; „*Elucidation of carotenoid patterns in citrus products by means of comprehensive normal-phase x reversed-phase liquid chromatography*“; Analytical Chemistry; **78** (2006) 7743 - 7750
- [59] Tian, H. Z., Xu, J., Xu, Y. und Guan, Y. F.; „*Multidimensional liquid chromatography system with an innovative solvent evaporation interface*“; Journal of Chromatography A; **1137** (2006) 42 - 48

- [60] Tian, H. Z., Xu, J. und Guan, Y. F.; „*Comprehensive two-dimensional liquid chromatography (NPLC x RPLC) with vacuum-evaporation interface*“; Journal of Separation Science; **31** (2008) 1677 - 1685
- [61] Verstraeten, M., Pursch, M., Eckerle, P., Luong, J. und Desmet, G.; „*Thermal Modulation for Multidimensional Liquid Chromatography Separations Using Low-Thermal-Mass Liquid Chromatography (LC)*“; Analytical Chemistry; **83** (2011) 7053 - 7060
- [62] Wilson, S. R., Jankowski, M., Pepaj, M., Mihailova, A., Boix, F., Truyols, G. V., Lundanes, E. und Greibrokk, T.; „*2D LC separation and determination of bradykinin in rat muscle tissue dialysate with on-line SPE-HILIC-SPE-RP-MS*“; Chromatographia; **66** (2007) 469 - 474
- [63] Kivilompolo, M. und Hyotylainen, T.; „*Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids*“; Journal of Chromatography A; **1145** (2007) 155 - 164
- [64] Francois, I., Sandra, K. und Sandra, P.; „*Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations-A review*“; Analytica Chimica Acta; **641** (2009) 14 - 31
- [65] Bedani, F., Kok, W. T. und Janssen, H. G.; „*Optimal gradient operation in comprehensive liquid chromatography x liquid chromatography systems with limited orthogonality*“; Analytica Chimica Acta; **654** (2009) 77 - 84
- [66] Liu, Z. Y., Patterson, D. G. und Lee, M. L.; „*Geometric Approach to Factor-Analysis for the Estimation of Orthogonality and Practical Peak-Capacity in Comprehensive 2-Dimensional Separations*“; Analytical Chemistry; **67** (1995) 3840 - 3845
- [67] Jandera, P.; „*Column selectivity for two-dimensional liquid chromatography*“; Journal of Separation Science; **29** (2006) 1763 - 1783

- [68] Neue, U. D., VanTran, K., Iraneta, P. C. und Alden, B. A.; „*Characterization of HPLC packings*“; Journal of Separation Science; **26** (2003) 174 - 186
- [69] Gilar, M., Olivova, P., Daly, A. E. und Gebler, J. C.; „*Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography*“; Analytical Chemistry; **77** (2005) 6426 - 6434
- [70] Raust, J. A., Bruell, A., Sinha, P., Hiller, W. und Pasch, H.; „*Two-dimensional chromatography of complex polymers, 8. Separation of fatty alcohol ethoxylates simultaneously by end group and chain length*“; Journal of Separation Science; **33** (2010) 1375 - 1381
- [71] Mondello, L., Herrero, M., Kumm, T., Dugo, P., Cortes, H. und Dugo, G.; „*Quantification in comprehensive two-dimensional liquid chromatography*“; Analytical Chemistry; **80** (2008) 5418 - 5424
- [72] Dugo, P., Herrero, M., Giuffrida, D., Kumm, T., Dugo, G. und Mondello, L.; „*Application of comprehensive two-dimensional liquid chromatography to elucidate the native carotenoid composition in red orange essential oil*“; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **56** (2008) 3478 - 3485
- [73] Mondello, L., Beccaria, M., Donato, P., Cacciola, F., Dugo, G. und Dugo, P.; „*Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the analysis of triacylglycerols in Borago officinalis*“; Journal of Separation Science; **34** (2011) 688 - 692
- [74] Slonecker, P. J., Li, X. D., Ridgway, T. H. und Dorsey, J. G.; „*Informational orthogonality of two dimensional chromatographic separations*“; Analytical Chemistry; **68** (1996) 682 - 689
- [75] Giddings, J. C.; „*Sample Dimensionality - A Predictor of Order-Disorder in Component Peak Distribution in Multidimensional Separation*“; Journal of Chromatography A; **703** (1995) 3 - 15

- [76] Quinones, I., Grill, C. M., Miller, L. und Guiochon, G.; „*Modeling of separations by closed-loop steady-state recycling chromatography of a racemic pharmaceutical intermediate*“; Journal of Chromatography A; **867** (2000) 1 - 21
- [77] Scherpian, P. und Schembecker, G.; „*Scaling-up recycling chromatography*“; Chemical Engineering Science; **64** (2009) 4068 - 4080
- [78] Simpson, C. F.; „*Techniques in liquid chromatography*“; John Wiley & Sons (1982)
- [79] Sreedhar, B., Damtew, A. und Seidel-Morgenstern, A.; „*Theoretical study of preparative chromatography using closed-loop recycling with an initial gradient*“; Journal of Chromatography A; **1216** (2009) 4976 - 4988
- [80] Bombaugh, K. J. und Levangie, R. F.; „*High Resolution Preparative Liquid Chromatography Using Recycle*“; Journal of Chromatographic Science; **8** (1970) 560
- [81] Biesenberger, J. A., Tan, M., Duvdevani, I. und Maurer, T.; „*Recycle Gel Permeation Chromatography .1. Recycle Principle and Design*“; Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters; **9** (1971) 353 - &
- [82] Araujo, J. M. M., Rodrigues, R. C. R., Silva, R. J. S. und Mota, J. P. B.; „*Single-column simulated moving-bed process with recycle lag: Analysis and applications*“; Adsorption Science & Technology; **25** (2007) 647 - 659
- [83] Martin, M., Verillon, F., Eon, C. und Guiochon, G.; „*Theoretical and Experimental-Study of Recycling in High-Performance Liquid-Chromatography*“; Journal of Chromatography; **125** (1976) 17 - 41
- [84] Lan, K. und Jorgenson, J. W.; „*Pressure-induced retention variations in reversed-phase alternate-pumping recycle chromatography*“; Analytical Chemistry; **70** (1998) 2773 - 2782
- [85] Seidelmorgenstern, A. und Guiochon, G.; „*Theoretical-Study of Recycling in Preparative Chromatography*“; Aiche Journal; **39** (1993) 809 - 819

- [86] Henry, R. A., Byrne, S. H. und Hudson, D. R.; „*High-Speed Recycle Chromatography Using An Alternate Pumping Principle*“; Journal of Chromatographic Science; **12** (1974) 197 - 199
- [87] Pettigrew J.; „*The Tea Companion*“; Quintet Publ, NY (1997) 168 -
- [88] Weiss, D. J. und Anderton, C. R.; „*Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography*“; Journal of Chromatography A; **1011** (2003) 173 - 180
- [89] Komes, D., Horzic, D., Belscak, A., Ganic, K. K. und Vulic, I.; „*Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds*“; Food Research International; **43** (2010) 167 - 176
- [90] Cuyckens, F. und Claeys, M.; „*Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids*“; Journal of Mass Spectrometry; **39** (2004) 1 - 15
- [91] Dalluge, J. J. und Nelson, B. C.; „*Determination of tea catechins*“; Journal of Chromatography A; **881** (2000) 411 - 424
- [92] Scharbert, S., Holzmann, N. und Hofmann, T.; „*Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse*“; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **52** (2004) 3498 - 3508
- [93] Nakagawa, M.; „*Chemical components and taste of green tee*“; Japan Agricultural Research Quarterly; **9** (1975) 156 - 160
- [94] Kalili, K. M. und de Villiers, A.; „*Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds*“; Journal of Separation Science; **34** (2011) 854 - 876
- [95] Worth, C. C. T., Wiessler, M. und Schmitz, O. J.; „*Analysis of catechins and caffeine in tea extracts by micellar electrokinetic chromatography*“; Electrophoresis; **21** (2000) 3634 - 3638

- [96] Weiss, D. J. und Anderton, C. R.; „*Determination of catechins in matcha green tea by micellar electrokinetic chromatography*“; *Journal of Chromatography A*; **1011** (2003) 173 - 180
- [97] Del Rio, D., Stewart, A. J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M. E. J., Brighenti, F. und Crozier, A.; „*HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea*“; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **52** (2004) 2807 - 2815
- [98] Lin, L. Z., Chen, P. und Harnly, J. M.; „*New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas*“; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **56** (2008) 8130 - 8140
- [99] Lin, L. Z. und Harnly, J. M.; „*A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials*“; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **55** (2007) 1084 - 1096
- [100] Singh, H. P., Ravindranath, S. D. und Singh, C.; „*Analysis of tea shoot catechins: Spectrophotometric quantitation and selective visualization on two-dimensional paper chromatograms using diazotized sulfanilamide*“; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **47** (1999) 1041 - 1045
- [101] Yi, L. Z., Liang, Y. Z., Wu, H. und Yuan, D. L.; „*The analysis of Radix Angelicae Sinensis (Danggui)*“; *Journal of Chromatography A*; **1216** (2009) 1991 - 2001
- [102] Dong, T. T. X., Zhao, K. J., Gao, Q. T., Ji, Z. N., Zhu, T. T., Li, J., Duan, R., Cheung, A. W. H. und Tsim, K. W. K.; „*Chemical and biological assessment of a chinese herbal decoction containing radix astragali and radix angelicae sinensis: Determination of drug ratio in having optimized properties*“; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **54** (2006) 2767 - 2774
- [103] Dong, Z. B., Li, S. P., Hong, A. und Zhu, Q.; „*Hypothesis of potential active components in Angelica sinensis by using biomembrane extraction and high*

- performance liquid chromatography*"; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; **38** (2005) 664 - 669
- [104] Peng, Z., Bi, Z. M., Li, P., Qi, L. W., Yi, L. und Tang, D.; „*LC-DAD-MS determination of the major constituents in Radix Angelicae sinensis*“; Chromatographia; **67** (2008) 973 - 978
- [105] Zhao, K. J., Dong, T. T. X., Tu, P. F., Song, Z. H., Lo, C. K. und Tsim, K. W. K.; „*Molecular genetic and chemical assessment of radix angelica (Danggui) in China*“; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **51** (2003) 2576 - 2583
- [106] Lao, S. C., Li, S. P., Kan, K. K. W., Li, P., Wan, J. B., Wang, Y. T., Dong, T. T. X. und Tsim, K. W. K.; „*Identification and quantification of 13 components in Angelica sinensis (Danggui) by gas chromatography-mass spectrometry coupled with pressurized liquid extraction*“; Analytica Chimica Acta; **526** (2004) 131 - 137
- [107] Chen, X. G., Kong, L., Su, X. Y., Fu, H. J., Ni, J. Y., Zhao, R. H. und Zou, H. F.; „*Separation and identification of compounds in Rhizoma chuanxiong by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry*“; Journal of Chromatography A; **1040** (2004) 169 - 178
- [108] Zhou, Y., Wang, Y., Wang, R. F., Guo, F. und Yan, C.; „*Two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry for the analysis of Lobelia chinensis Lour. using an ESI/APCI multimode ion source*“; Journal of Separation Science; **31** (2008) 2388 - 2394
- [109] Michel, R. H., McGovern, P. E. und Badler, V. R.; „*The 1St Wine and Beer*“; Analytical Chemistry; **65** (1993) A408 - A413
- [110] McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J. und Voigt, M. M.; „*Neolithic resinated wine*“; Nature; **381** (1996) 480 - 481
- [111] Berkowitz, M.; „*World's earliest wine*“; Archaeology; **49** (1996) 26 - 26
- [112] Belitz, H. D., Grosch, W. und Schieberle, P.; „*Lebensmittelchemie*“; **sechste Auflage** (2008)

- [113] Spanos, G. A. und Wrolstad, R. E.; „*Influence of Processing and Storage on the Phenolic Composition of Thompson Seedless Grape Juice*“; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **38** (1990) 1565 - 1571
- [114] Mattila, P., Hellstrom, J. und Torronen, R.; „*Phenolic acids in berries, fruits, and beverages*“; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **54** (2006) 7193 - 7199
- [115] Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. und Ryan, D.; „*Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits*“; Analyst; **125** (2000) 989 - 1009
- [116] Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S. und Tonogai, Y.; „*Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography*“; Journal of Chromatography A; **891** (2000) 183 - 188
- [117] Kivilompolo, M., Oburka, V. und Hyotylainen, T.; „*Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in the analysis of antioxidant phenolic compounds in wines and juices*“; Analytical and Bioanalytical Chemistry; **391** (2008) 373 - 380
- [118] Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Karumanchiri, A. und Goldberg, D. M.; „*A multiresidue derivatization gas chromatographic assay for fifteen phenolic constituents with mass selective detection*“; Analytical Chemistry; **69** (1997) 4405 - 4409
- [119] Carando, S., Teissedre, P. L. und Cabanis, J. C.; „*HPLC coupled with fluorescence detection for the determination of procyanidins in white wines*“; Chromatographia; **50** (1999) 253 - 254
- [120] Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Airado-Rodriguez, D., Herrero, M. und Mondello, L.; „*Comprehensive two-dimensional liquid chromatography to quantify polyphenols in red wines*“; Journal of Chromatography A; **1216** (2009) 7483 - 7487
- [121] Billiet, H. A. H., Keehnen, P. D. M. und Degalan, L.; „*Single-Pump Solvent Programmer for High-Performance Liquid-Chromatography Using Synchronized Valve Switching*“; Journal of Chromatography; **185** (1979) 515 - 528

- [122] Horvath, K., Fairchild, J. N. und Guiochon, G.; „*Generation and Limitations of Peak Capacity in Online Two-Dimensional Liquid Chromatography*“; Analytical Chemistry; **81** (2009) 3879 - 3888
- [123] Potts, L. W., Stoll, D. R., Li, X. P. und Carr, P. W.; „*The impact of sampling time on peak capacity and analysis speed in on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography*“; Journal of Chromatography A; **1217** (2010) 5700 - 5709
- [124] Hoffman, N. E., Pan, S. L. und Rustum, A. M.; „*Injection of Elutes in Solvents Stronger Than the Mobile Phase in Reversed-Phase Liquid-Chromatography*“; Journal of Chromatography; **465** (1989) 189 - 200
- [125] Schoenmakers, P. J., Vivo-Truyols, G. und Decrop, W. M. C.; „*A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems*“; Journal of Chromatography A; **1120** (2006) 282 - 290
- [126] Li, X. P. und Carr, P. W.; „*Effects of first dimension eluent composition in two-dimensional liquid chromatography*“; Journal of Chromatography A; **1218** (2011) 2214 - 2221
- [127] Sandi, A. und Szepesy, L.; „*Characterization of various reversed-phase columns using the linear free energy relationship I. Evaluation based on retention factors*“; Journal of Chromatography A; **818** (1998) 1 - 17
- [128] Sandi, A. und Szepesy, L.; „*Characterization of various reversed-phase columns using the linear free energy relationship II. Evaluation of selectivity*“; Journal of Chromatography A; **818** (1998) 19 - 30
- [129] Sandi, A., Nagy, M. und Szepesy, L.; „*Characterization of reversed-phase columns using the linear free energy relationship III. Effect of the organic modifier and the mobile phase composition*“; Journal of Chromatography A; **893** (2000) 215 - 234
- [130] Kimata, K., Iwaguchi, K., Onishi, S., Jinno, K., Eksteen, R., Hosoya, K., Araki, M. und Tanaka, N.; „*Chromatographic Characterization of Silica-C-18 Packing*“

Materials - Correlation Between A Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase"; Journal of Chromatographic Science; **27** (1989) 721 - 728

- [131] Adahchour, M., Brandt, M., Baier, H. U., Vreuls, R. J. J., Batenburg, A. M. und Brinkman, U. A. T.; „*Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer: principles and applications*“; Journal of Chromatography A; **1067** (2005) 245 - 254
- [132] Dyson, N.; „*Peak distortion, data sampling errors and the integrator in the measurement of very narrow chromatographic peaks*“; Journal of Chromatography A; **842** (1999) 321 - 340
- [133] Hinshaw, J. V.; „*Handling fast peaks*“; Lc Gc North America; **21** (2003) 268
- [134] Lazarus, S. A., Adamson, G. E., Hammerstone, J. F. und Schmitz, H. H.; „*High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages*“; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **47** (1999) 3693 - 3701
- [135] Guo, Q., Zhao, B. L., Shen, S. R., Hou, J. W., Hu, J. G. und Xin, W. J.; „*ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers*“; Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects; **1427** (1999) 13 - 23
- [136] Wang, Y. Y. et al.; „*Simultaneous determination of theanine, gallic acid, purine alkaloids, catechins, and theaflavins in black tea using HPLC*“; International Journal of Food Science and Technology; **45** (2010) 1263 - 1269
- [137] Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B. und Engelhardt, U. H.; „*Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages*“; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **48** (2000) 2848 - 2852
- [138] Finger, A., Engelhardt, U. H. und Wray, V.; „*Flavonol Triglycosides Containing Galactose in Tea*“; Phytochemistry; **30** (1991) 2057 - 2060

- [139] Worth, C. C. T., Wiessler, M. und Schmitz, O. J.; „*Analysis of catechins and caffeine in tea extracts by micellar electrokinetic chromatography*“; *Electrophoresis*; **21** (2000) 3634 - 3638
- [140] Kang, J. H., Chung, S. T., Go, J. H. und Row, K. H.; „*Separation of epigallocatechin gallate from Korean green tea by RP-HPLC*“; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*; **23** (2000) 2739 - 2749
- [141] Stach, D. und Schmitz, O. J.; „*Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography*“; *Journal of Chromatography A*; **924** (2001) 519 - 522
- [142] Roberts, E. A. H., Cartwright, D. J. und Wood, D. J.; „*The flavonols of tea*“; *Journal of the Science Food and Agriculture*; **7** (1956) 637 - 646
- [143] Singh, H. P., Ravindranath, S. D. und Singh, C.; „*Analysis of tea shoot catechins: Spectrophotometric quantitation and selective visualization on two-dimensional paper chromatograms using diazotized sulfanilamide*“; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **47** (1999) 1041 - 1045
- [144] Schulze, A.; „*Analyse von Teeproben mittels LCxLC-qTOF(MS) und GCxGC-TOF(MS)*“ *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Bergischen Universität Wuppertal* (2010)
- [145] Rauha, J. P., Vuorela, H. und Kostianen, R.; „*Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry*“; *Journal of Mass Spectrometry*; **36** (2001) 1269 - 1280
- [146] Bastos, D. H. M., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A. C. H. F., Cunha, I. B. S., Carvalho, P. O. und Eberlin, M. N.; „*Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts*“; *Molecules*; **12** (2007) 423 - 432

- [147] Mizooku, Y., Yoshikawa, M., Tsuneyoshi, T. und Arakawa, R.; „*Analysis of oxidized epigallocatechin gallate by liquid chromatography/mass spectrometry*“; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*; **17** (2003) 1915 - 1918
- [148] Goto, T., Yoshida, Y., Kiso, M. und Nagashima, H.; „*Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea*“; *Journal of Chromatography A*; **749** (1996) 295 - 299
- [149] Giddings, J. C.; „*Two-Dimensional Separations - Concept and Promise*“; *Analytical Chemistry*; **56** (1984) 1258 - 1270
- [150] Giddings, J. C.; „*Concepts and Comparisons in Multidimensional Separation*“; *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*; **10** (1987) 319 - 323
- [151] Stoll, D. R., Li, X. P., Wang, X. O., Carr, P. W., Porter, S. E. G. und Rutan, S. C.; „*Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography*“; *Journal of Chromatography A*; **1168** (2007) 3 - 43
- [152] Cohen, S. A. und Schure, M. R.; „*Multidimensional Liquid Chromatography*“; Wiley-Interscience (2008)
- [153] Gray, M., Dennis, G. R., Wormell, P., Shalliker, R. A. und Slonecker, P.; „*Two dimensional reversed-phase-reversed-phase separations - Isomeric separations incorporating C-18 and carbon clad zirconia stationary phases*“; *Journal of Chromatography A*; **975** (2002) 285 - 297
- [154] Duck, R., Sonderfeld, H. und Schmitz, O. J.; „*A simple method for the determination of peak distribution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography*“; *Journal of Chromatography A*; **1246** (2012) 69 - 75
- [155] Anton, H.; „*Elementary linear algebra*“; **second Edition**, JOHN WILEY & SONS New York (1977) 104 - 109
- [156] Blumberg, L. M.; „*Linear peak capacity of a comprehensive multi-dimensional separation*“; *Journal of Separation Science*; **31** (2008) 3352 - 3357

- [157] Karu, N., Dicoski, G. W., Hanna-Brown, M. und Haddad, P. R.; „*Determination of pharmaceutically related compounds by suppressed ion chromatography: I. Effects of organic solvent on suppressor performance*“; Journal of Chromatography A; **1218** (2011) 9037 - 9045
- [158] Haddad, P. R., Nesterenko, P. N. und Buchberger, W.; „*Recent developments and emerging directions in ion chromatography*“; Journal of Chromatography A; **1184** (2008) 456 - 473
- [159] Mascolo, G., Lopez, A., Detomaso, A. und Lovecchio, G.; „*Ion chromatography-electrospray mass spectrometry for the identification of low-molecular-weight organic acids during the 2,4-dichlorophenol degradation*“; Journal of Chromatography A; **1067** (2005) 191 - 196
- [160] Johns, C., Shellie, R. A., Pohl, C. A. und Haddad, P. R.; „*Two-dimensional ion chromatography using tandem ion-exchange columns with gradient-pulse column switching*“; Journal of Chromatography A; **1216** (2009) 6931 - 6937
- [161] van Dam, J. C., Eman, M. R., Frank, J., Lange, H. C., van Dedem, G. W. K. und Heijnen, S. J.; „*Analysis of glycolytic intermediates in Saccharomyces cerevisiae using anion exchange chromatography and electrospray ionization with tandem mass spectrometric detection*“; Analytica Chimica Acta; **460** (2002) 209 - 218
- [162] Zhou, F., Sikorski, T. W., Ficarro, S. B., Webber, J. T. und Marto, J. A.; „*Online Nanoflow Reversed Phase-Strong Anion Exchange-Reversed Phase Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Platform for Efficient and In-Depth Proteome Sequence Analysis of Complex Organisms*“; Analytical Chemistry; **83** (2011) 6996 - 7005
- [163] Zakaria, P., Dicoski, G. W., Ng, B. K., Shellie, R. A., Hanna-Brown, M. und Haddad, P. R.; „*Application of retention modelling to the simulation of separation of organic anions in suppressed ion chromatography*“; Journal of Chromatography A; **1216** (2009) 6600 - 6610

- [164] Baziramakenga, R., Simard, R. R. und Leroux, G. D.; „*Determination of Organic-Acids in Soil Extracts by Ion Chromatography*“; *Soil Biology & Biochemistry*; **27** (1995) 349 - 356
- [165] Brudin, S. S., Shellie, R. A., Haddad, P. R. und Schoenmakers, P. J.; „*Comprehensive two-dimensional liquid chromatography: Ion chromatography x reversed-phase liquid chromatography for separation of low-molar-mass organic acids*“; *Journal of Chromatography A*; **1217** (2010) 6742 - 6746
- [166] Holland, L. A. und Jorgenson, J. W.; „*Characterization of a comprehensive two-dimensional anion exchange-perfusive reversed phase liquid chromatography system for improved separations of peptides*“; *Journal of Microcolumn Separations*; **12** (2000) 371 - 377
- [167] Opiteck, G. J., Lewis, K. C., Jorgenson, J. W. und Anderegg, R. J.; „*Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins*“; *Analytical Chemistry*; **69** (1997) 1518 - 1524
- [168] Pol, J., Hohnova, B., Jussila, M. und Hyotylainen, T.; „*Comprehensive two-dimensional liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry in the analysis of acidic compounds in atmospheric aerosols*“; *Journal of Chromatography A*; **1130** (2006) 64 - 71
- [169] Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L. W. und Heber, D.; „*Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity*“; *Nutrition and Cancer-An International Journal*; **45** (2003) 226 - 235
- [170] Friedman, M. und Jurgens, H. S.; „*Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds*“; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **48** (2000) 2101 - 2110
- [171] United States National Library of Medicine, N.; „<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>“; (2012)

- [172] Herrero-Martinez, J. M., Sanmartin, M., Roses, M., Bosch, E. und Rafols, C.; „*Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis*“; *Electrophoresis*; **26** (2005) 1886 - 1895
- [173] Tyrrell, E., Dicoski, G. W., Hilder, E. F., Shellie, R. A., Breadmore, M. C., Pohl, C. A. und Haddad, P. R.; „*Coupled reversed-phase and ion chromatographic system for the simultaneous identification of inorganic and organic explosives*“; *Journal of Chromatography A*; **1218** (2011) 3007 - 3012
- [174] Crary, J. R., Cainjanicki, K. und Wijayaratne, R.; „*External Recycle Chromatography - A Practical Method for Preparative Purifications*“; *Journal of Chromatography*; **462** (1989) 85 - 94
- [175] van der Horst, A. und Schoenmakers, P. J.; „*Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers*“; *Journal of Chromatography A*; **1000** (2003) 693 - 709
- [176] Wang, Y. L., Liang, Y. Z., Chen, B. M., He, Y. K., Li, B. Y. und Hu, Q. N.; „*LC-DAD-APCI-MS-based screening and analysis of the absorption and metabolite components in plasma from a rabbit administered an oral solution of danggui*“; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; **383** (2005) 247 - 254
- [177] Huang, W. Y. und Sheu, S. J.; „*Separation and identification of the organic acids in Angelicae Radix and Ligustici Rhizoma by HPLC and CE*“; *Journal of Separation Science*; **29** (2006) 2616 - 2624